

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM NEUROCIÊNCIAS

FERNANDA NOAL CARLESSO

**MECANISMO DE AÇÃO DO BROMETO DE SÓDIO EM FATIAS DE HIPOCAMPO
DE RATOS**

PORTO ALEGRE

2011

FERNANDA NOAL CARLESSO

**MECANISMO DE AÇÃO DO BROMETO DE SÓDIO EM FATIAS DE HIPOCAMPO
DE RATOS**

Tese de doutorado apresentado como requisito para título de doutor ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

ORIENTADOR: PROF. DR. JADERSON COSTA DA COSTA

CO-ORIENTADOR: PROF.DR. ANTÔNIO-CARLOS GUIMARÃES DE ALMEIDA

PORTO ALEGRE
2011

FERNANDA NOAL CARLESSO

**MECANISMO DE AÇÃO DO BROMETO DE SÓDIO EM FATIAS DE HIPOCAMPO
DE RATOS**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luis Palmiini -PUCRS

Profa. Dra. Cristina Maria Moriguchi Jeckel - PUCRS

Prof. Dr. Antônio Márcio Rodrigues - UFSJ

Dr.Fabício Simão - PUCRS

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

C278m Carlesso, Fernanda Noal

Mecanismo de ação do brometo de sódio em fatias de hipocampo de ratos / Fernanda Noal Carlesso. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

117 f.: il. tab. Inclui um artigo científico submetido para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Neurociências.

1. BROMETOS/farmacologia. 2. BROMETOS/uso terapêutico. 3. BLOQUEADORES DOS CANAIS DE SÓDIO. 4. 1-OCTANOL. 5. EPILEPSIA. 6. ANTICONVULSIVANTES. 7. HIPOCAMPO/efeitos de drogas. 8. ANIMAIS DE LABORATÓRIO. 9. RATOS. 10. IN VITRO. 11. ESTUDOS DE INTERVENÇÃO. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Título.

C.D.D. 616.853

C.D.U. 616.853:661.833.321(043.2)

N.L.M. WL 385

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo e apoio em todos os momentos dessa trajetória. Que a concretização desse trabalho seja motivo de orgulho deles mesmo não estando mais presentes.

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao Prof. Dr. Antônio Márcio pelas orientações, discussões e sugestões importantes para o engrandecimento do meu trabalho.

À Profa. Ana Paula Madureira pelas orientações nas análises estatísticas deste estudo.

Aos outros professores do laboratório de Neurociências Computacional e Experimental por todo apoio e disponibilidade para resolver problemas eminentes na execução do trabalho.

A todos os colegas (Aline, Keite, Luiz, Kelisson, Delmo, Gláucio, Gisele, Karla, Mariana, Jassara, Maíra, Maísa, Vítor e Renato) do Laboratório de Neurociência Computacional e Experimental pelo apoio e acolhimento durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas Aline, Lucélia, Maisinha e Luiz que tiveram uma participação maior no meu trabalho tanto na parte experimental como nas discussões dos resultados obtidos.

À secretária Simone Nascimento por sempre estar disposta a ajudar.

As funcionárias Dalva e Simone do Lanec que além de capricharem no nosso ambiente de trabalho, com descontração e energia fizeram do LANEC um lugar extremamente agradável.

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

A querida Daniela, pela amizade e por estar sempre pronta a me auxiliar no trabalho.

A minha "Mammys especial Nelcy N. Arndt" que me adotou como filha "postiça", dando muito carinho, amizade, força, ensinamentos e orientações em todos os momentos.

As minhas outras "mães do coração" que me adotaram como filha.

Aos amigos Jociane e Mauro, pela amizade e por sempre estarem me auxiliando na formatação do trabalho.

As amigas da república pelo acolhimento, amizade e companheirismo.

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

Aos meus pais, irmãos, dinda, tlo Miguel e avó Sílvia pela extrema dedicação, incentivo, carinho e apoio para concluir este trabalho.

A todos meus familiares que me motivaram a finalizar meu doutorado

Ao meu querido Igor R. Campos Ferreira pelo amor, carinho e companheirismo.

Aos familiares do Igor que me acolheram e apoiaram no término deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes-PROCAD), por proporcionar a bolsa de intercâmbio e auxílio financeiro para o trabalho.

À PUCRS pela bolsa de estudo Pro-Bolsa/PUCRS.

E, principalmente, a Deus por me fazer forte e confiante.

RESUMO

O brometo de sódio, fármaco antiepilético de primeira geração, ainda é utilizado para tratar epilepsia refratária em crianças. Seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado. Neste trabalho propomos, i- investigar sua ação nas atividades epileptiformes (AE'S) de natureza não-sináptica na região do giro dentado *in vitro*; ii- comparar sua ação com solução contendo alta concentração de cloreto de sódio; com bloqueadores de canais de cloreto dependente de voltagem (SITS, DIDS); iii- investigar o possível envolvimento das *gap junctions* no momento da atuação do fármaco. O estudo envolveu medidas experimentais tais como registros extracelulares de campo e medidas do sinal óptico intrínseco. Obtivemos inibição das AE'S induzidas pelo modelo do zero cálcio e alto potássio com 9 mM de NaBr (n=6). Com a perfusão da solução de zero Ca^{++} + alta concentração de NaCl nos registros (n=7) de campo, obtivemos um bloqueio transitório. Comparou-se o efeito do NaBr com os bloqueadores de canais de cloreto dependente de voltagem o SITS 1mM (n=3) e DIDS 250 μ M (n=8), obteve-se uma semelhança nos registros de potencial elétrico extracelular, mostrando possível envolvimento dos canais de cloreto dependente de voltagem. O bloqueador de *gap junctions* (N-octanol) em concentrações de 0,07mM foi utilizado juntamente com o brometo 5mM. Este reduziu à alta frequência elucidada no período transiente durante a aplicação da droga. O efeito do Br^- não é apenas no potencial de membrana, por meio de sua maior permeabilidade em relação ao Cl^- induzindo hiperpolarização, mas apresenta também uma maior permeabilidade aos canais de cloreto dependente de voltagem. O aumento da frequência das descargas pode ser devido ao efeito competitivo do Br^- sobre os canais de cloreto, reduzindo a permeabilidade ao Cl^- . O NaBr tem pouca afinidade pelos cotransportadores NKCC1 e substitui parcialmente Cl^- nos cotransportadores KCC2. A origem da alta frequência nos registros com o brometo, provavelmente está relacionada com as *gaps junctions*.

ABSTRACT

Sodium bromide, first-generation antiepileptic drug, is still used to treat refractory epilepsy in children. Its mechanism is not fully elucidated. In this work, i-investigate its actions on the epileptiform activity (EA's) of non-synaptic region of the *dentate gyrus in vitro*, ii-compare his action with a solution containing high concentration of sodium chloride; blocker of chloride channels voltage dependent (SITS, DIDS), iii-investigate the possible involvement of *gap junctions* at the time of action of the drug. The study involved experimental measurements such as extracellular field records and computer simulations. AE'S returned inhibition induced model of zero calcium and high potassium with 9 mM NaBr (n=6). With the perfusion of calcium solution zero high concentration of NaCl in the records (n=6) obtained a field transient blockage. We compared the effect of NaBr with chloride channel blockers of voltage-dependent (DIDS 250 μ M, n=8 and SITS 1 mM, n=3), we obtained a similarity in the records of extracellular field potential, suggesting a possible involvement of chloride channels voltage dependent. The blocker of *gap junctions* (N-octanol) at concentrations of 0,07 mM was used with 5 mM bromide. This reduced the high frequency elucidated in the transient period during drug application. The effect of Br⁻ isn't just in membrane potential, through its greater permeability compared to the Cl⁻ inducing hyperpolarization, but also show a higher permeability to the chloride channels voltage-dependent. The increased frequency of discharges can be due to the competitive effect of Br⁻ on chloride channels, reducing the permeability to Cl⁻. The NaBr has a little affinity for the cotransporter NKCC1 and partially replacing Cl⁻ in cotransporter KCC2. The origin of high frequency in records with bromide, is probably related with the *gaps junctions*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Registro de eventos epileptiformes não-sinápticos	20
Figura 2 Características dos <i>bursts</i> da região do giro dentado.	21
Figura 3 Efeitos do pH_o em <i>bursts</i> prolongados na camada granular do giro dentado	24
Figura 4 A duração dos <i>bursts</i> espontâneos se correlaciona com a acidificação do pH_i	25
Figura 5 Esquema ilustrativo da Homeostase do cloreto..	26
Figura 6 Mecanismos de transporte por trás das respostas mediadas por receptores $GABA_A$ e glicina em neurônios imaturos e maduros	32
Figura 7 Regulação do desenvolvimento da expressão de NKCC1e KCC2 coincide com as mudanças de GABA induzida por correntes de Cl^- despolarizantes (excitatório) para hiperpolarizantes (inibitória).....	33
Figura 8 Exemplo típico de um experimento com aplicação de brometo.	46
Figura 9 Esquema do procedimento realizado para a retirada do encéfalo da cavidade craniana.	47
Figura 10 Fatiador do tipo “McIlwain tissue slicer”	48
Figura 11 Diagrama esquemático da câmara de perfusão montada com tubos e conexões em PVC.....	50
Figura 12 Câmara de interface.	51
Figura 13 Equipamentos utilizados para obtenção do registro simultâneo do PE e do IOS durante as AE's em fatias do hipocampo..	53
Figura 14 Procedimento para obtenção da componente DC.....	55
Figura 15 Representação do procedimento adotado para obtenção da amplitude dos PS's.	55
Figura 16 Exemplo da técnica utilizada para o cálculo da duração do evento.	56
Figura 17 Representação esquemática do procedimento para compor as imagens CET.	58
Figura 18 Casos típicos dos registros de potenciais de campo nas quatro concentrações de NaBr.	60

Figura 19 Exemplo de um registro de campo com aplicação de NaBr 9 mM de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao NaBr 5mM (tempo: 20 min).	61
Figura 20 Gráfico da relação concentração-resposta (redução ou supressão das AE's pelo NaBr 5, 7, 9 e 11mM).	62
Figura 21 Efeito do NaBr no componente DC e nas variáveis de PS, IE e DE.....	63
Figura 22 Em (A) exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao NaCl 142 mM (tempo: 20 min). Em (B) a média do IE (s) de 6 eventos antes da aplicação de NaCl foi utilizada como fator de normalização, ou seja, o intervalo para cada evento após a aplicação foi dividido por esse fator mostrando que o IE aumenta com cerca de 1 min e retorna após 20 min de aplicação.....	64
Figura 23 Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao SITS 1mM (tempo: 20 min). Após o registro foi feita a curva com alta concentração de NaCl, simulando o registro.	65
Figura 24 Em A: Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao DIDS 250µM (tempo: 20 min). Concomitante ao sinal elétrico foi registrado o sinal óptico intrínseco (B).....	66
Figura 25 Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao NaBr 5mM (a) e após a mesma fatia foi submetida ao NaBr 5mM + Octanol 0,07mM (b)(tempo: 20 min).	67
Figura 26 Potencial extracelular (A) e imagens IOS (B) simultâneas, antes, durante e depois da aplicação do NaBr (barra superior).	68
Figura 27 ER normalizada, medida para cada evento (círculos), antes, durante e depois da aplicação da NaBr (conforme barras superiores), para cada concentração (5, 7, 9 e 11mM) investigadas..	69
Figura 28 ER normalizada, medida para cada evento (círculos), antes, durante e depois da aplicação de SITS (conforme barra superior)..	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Mudanças no potencial reverso e proporções da permeabilidade dos ânions.....	27
Tabela 2 Farmacologia dos canais de cloreto.....	29
Tabela 3 Composições das soluções de perfusão nos experimentos com fatias de hipocampos de rato	49

LISTA DE ABREVIATURAS

- AE's- atividades epileptiformes
- ACSF- líquido cefalorraquidiano artificial
- ACSF zero Ca^{++} + alto K^+ - líquido cefalorraquidiano artificial sem Ca^{++} + alto K^+
- Br^- - íon bromo
- Cl^- - íons cloro
- CCCs- cotransportadores de cátion-cloreto
- CET- característica espaço temporal
- Cl^- - íons cloro
- CIC- canais de cloreto dependentes de voltagem
- $[\text{Cl}^-]_i$ - concentração de cloreto intracelular
- $[\text{Cl}^-]_o$ - concentração de cloreto extracelular
- CSF- líquido cefalorraquidiano
- CTG- crises tônico-clônicas generalizadas
- DC- componente DC
- DE- duração dos eventos
- DIDS- ácido 4,4-diisotiocinatoestilbeno-2,2-disulfônico
- DS- descargas em salva (do inglês *burst*)
- E_{Cl^-} potencial de Nernst do cloreto
- E_{K^+} potencial de Nernst do potássio
- E_{GABA^-} potencial de Nernst do GABA
- $E_{\text{GABA}_A^-}$ potencial de Nernst do GABA_A
- EEG- eletroencefalograma
- ER- extensão de recrutamento
- FAE's- fármacos antiepilépticos
- FCE- fluido cérebro espinhal
- GABA- ácido gama-aminobutírico
- GABA_A - Receptor GABA_A
- GD- giro dentado
- $[\text{H}^+]_o$ - concentração de H^+ extracelular
- IE- intervalo entre eventos
- KCC- cotransportador de K^+ - Cl^-

$[k^+]_o$ - concentração de potássio extracelular

NaBr- brometo de sódio

NKCC- cotransportador de cloreto $Na^+ - K^+ - 2Cl^-$

NaBr- brometo de sódio

PDS- despolarização paroxística

pH_i - pH intracelular

PIPS- potenciais pós-sinápticos inibitórios

PS- populações de espículas, do inglês *population spikes*

SITS- ácido 4-acetamido-4-isotiocianatoestilbeno-2,2'- disulfônico ácido

VTL- variação de transmitância de luz

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	EPILEPSIA	16
1.1.1	<i>Epilepsia nas crianças e tratamento farmacológico</i>	17
1.1.2	<i>Epilepsias in vitro</i>	18
1.2	MODELO DE ATIVIDADES EPILEPTIFORMES NÃO-SINÁPTICAS.....	19
1.3	MECANISMOS NÃO-SINÁPTICOS.....	21
1.3.1	<i>Papel das gaps junctions e influências do pH</i>	23
1.4	CONTROLE DA HOMEOSTASE DO CLORETO NO MEIO INTRA E EXTRACELULAR	26
1.4.1	<i>Canais de cloreto do tipo dependente de voltagem</i>	27
1.4.2	<i>Cotransportadores de cátion-cloreto (CCCs)</i>	29
1.4.3	<i>Farmacologia dos CCCs e seletividade dos íons</i>	34
1.4.4	<i>CCCs e a bomba de Na⁺-K⁺ ATPase de membrana</i>	35
1.4.5	<i>CCCs e Epilepsia</i>	35
1.4.6	<i>Bloqueadores de CCCs como drogas anticonvulsivantes putativas</i>	36
1.5	FÁRMACO BROMETO DE SÓDIO.....	37
1.6	JUSTIFICATIVA	41
2	OBJETIVOS	43
2.1	GERAL	43
2.2	ESPECÍFICOS	43
3	METODOLOGIA	44
3.1	ANIMAIS.....	44
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	44
3.2.1	<i>Grupo Controle</i>	44
3.2.2	<i>Grupo NaBr</i>	44
3.2.3	<i>Grupo NaCl</i>	44
3.2.4	<i>Grupo SITS</i>	45
3.2.5	<i>Grupo DIDS</i>	45
3.2.6	<i>Grupo OCTANOL + NaBr</i>	45
3.3	CURVA DE ALTA CONCENTRAÇÃO DE NaCl	45
3.4	PREPARO E MANUTENÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAIS.....	46
3.5	SOLUÇÕES DE PERFUSÃO	48
3.6	REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO - EQUIPAMENTOS.....	49
3.6.1	<i>Câmara de perfusão</i>	49
3.6.2	<i>Câmara de interface</i>	50
3.6.3	<i>Registro do Potencial Elétrico Extracelular (PE)</i>	52
3.7	ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PARÂMETROS DO POTENCIAL ELÉTRICO EXTRACELULAR (PE)	54
3.8	ANÁLISE QUANTITATIVA DA AMPLITUDE DA COMPONENTE DC.....	54
3.9	ANÁLISE QUANTITATIVA DA AMPLITUDE DOS <i>POPULATIONS SPIKES</i> ..	55
3.10	ANÁLISE QUANTITATIVA DA DURAÇÃO DOS EVENTOS	55
3.11	SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO	56
4	RESULTADOS	59
4.1	POTENCIAL ELÉTRICO EXTRACELULAR	59
4.1.1	<i>Grupo NaBr</i>	59

4.1.2	<i>Grupo NaCl 142 mM</i>	63
4.1.3	<i>Grupo Sits e Dids</i>	65
4.1.4	<i>Grupo Octanol</i>	66
4.1.5	<i>Sinal Óptico Intrínseco</i>	67
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÕES	77
6.1	PERSPECTIVAS FUTURAS	78
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXOS	86
	ANEXO A – MECHANISMS BY WHICH SODIUM BROMIDE BLOCKS NONSYNAPTIC EPILEPTIFORM ACTIVITY	87
	ANEXO B – COMBINED EFFECT OF BUMETANIDE, BROMIDE AND GABAERGIC AGONISTS - AN ALTERNATIVE TREATMENT FOR INTRACTABLE SEIZURES	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPILEPSIA

Epilepsia é um tipo de disfunção cerebral caracterizada clinicamente por alterações subjetivas ou comportamentais súbitas (crises epiléticas), com tendência a se repetirem ao longo da vida do paciente. Essas crises refletem uma atividade anormal, de início súbito, acometendo uma ou várias áreas do córtex cerebral. Essa alteração da atividade elétrica cortical, por sua vez, pode ser causada por um número de patologias estruturais e neuroquímicas.(1-4)

Admite-se epilepsia como um grupo de doenças que têm em comum, crises epiléticas que ocorrem na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril. A epilepsia é, naturalmente, não uma doença específica, ou mesmo uma síndrome única, mas uma ampla categoria de complexos de sintomas decorrentes de qualquer número de funções do cérebro desordenado que pode ser secundário a uma variedade de processos patológicos.(5)

As crises epiléticas são eventos clínicos que refletem disfunção temporária de um conjunto de neurônios de parte do encéfalo. Os sintomas de uma crise dependem das partes do cérebro envolvidas na disfunção(1). É importante ressaltar que as crises epiléticas são resultado de descargas anormais excessivas em uma população de neurônios hiperexcitáveis, resultante de correntes elétricas que são fruto da movimentação iônica da membrana celular.(3)

A Classificação atual das crises epiléticas baseia-se na classificação de 1981, partindo de um consenso de especialistas, análise de crises por gravações de vídeo e considerando a sua semiologia como uma seqüência de eventos ictais desenvolvidos no tempo. Além da fenomenologia clínica, o eletroencefalograma (EEG) ictal e interictal foram considerados. A dicotomia parcial/ generalizada foi preservada, mas a distinção entre simples e crises parciais complexas foi inteiramente baseado em perda da consciência.(6)

As crises epiléticas são uma das formas pelas quais se definem e classificam-se as epilepsias. Existem duas classificações para as crises epiléticas segundo a Liga Internacional Contra Epilepsia: crises parciais: originam-se em um pequeno grupo de neurônios que constituem o foco da crise; e crises generalizadas:

caracterizadas pelo envolvimento dos dois hemisférios desde o início da crise.(1, 2, 7)

As síndromes epiléticas foram identificadas por seus tipos característicos de crises, o padrão de recorrência das crises, idade de início, associadas a sinais clínicos e neurológicos, achados eletroencefalograma (EEG), presença ou ausência de ocorrência familiar e prognóstico. Epilepsias e síndromes epiléticas são geralmente divididas em idiopáticas e sintomáticas.(6, 8)

As epilepsias idiopáticas são geralmente benignas, no sentido em que não estão associadas a lesões cerebrais, anormalidades neurológicas que não crises ou deficiência mental, e tendem a ser autolimitadas ou responder prontamente às drogas antiepiléticas. Fatores genéticos são importantes, e as manifestações são geralmente relacionadas com a idade.(1, 5, 9)

Epilepsias sintomáticas acontecem em consequência de uma lesão identificável ou etiologia demonstrável física ou metabólica. As epilepsias nos adultos são classificadas como sintomáticas, relacionadas à localização do foco. Dentre as causas destas epilepsias podemos citar traumas, derrames, tumores e infecções.(8)

O entendimento das síndromes epiléticas favorece a um bom prognóstico e também na escolha da terapia. O tratamento medicamentoso das epilepsias é ainda, em última análise, aceito como tratamento sintomático, isto é, visa primariamente o controle das crises epiléticas.(6, 8, 10)

A seleção dos fármacos é baseada, primariamente, em sua eficácia para tipos específicos de crises e epilepsias. Outros aspectos que devem ser levados em conta são: efeito colateral via de administração, propriedades farmacológicas e interações medicamentosas. Além disso, em países com características socioeconômicas como as brasileiras o custo da medicação é relevante, ainda mais que o tempo de utilização do medicamento pelo paciente é indeterminado.(1, 6, 8)

1.1.1 Epilepsia nas crianças e tratamento farmacológico

A epilepsia é uma das desordens neurológicas comum na infância que acomete aproximadamente 0,5% a 1% da população infantil. Embora quase 60% das síndromes epiléticas em crianças sejam remissivas, 8% a 28% das crianças

apresentam pelo menos duas crises convulsivas refratárias ao tratamento clínico.(11-13)

Na Europa e nos Estados Unidos 31 anticonvulsivantes foram aprovados para uso, 11 desses fármacos antiepilépticos (FAE's) foram aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA), apenas nos últimos 20 anos. Apesar da disponibilidade de novas opções terapêuticas, a taxa de falha do primeiro FAE utilizado em crianças com epilepsia recém-diagnosticada permanece muito elevada (20% a 40%). Essas falhas foram atribuídas tanto à alta incidência de efeitos adversos e/ou falta de eficácia dos fármacos.(12)

As escolhas do tratamento para a epilepsia são baseadas em estudos clínicos e experiências clínicas, mas as respostas aos fármacos e os efeitos adversos podem em parte, ser estimados com base nos mecanismos de ação conhecidos das drogas. Os fármacos antiepilépticos à nível molecular, atuam através da inibição dos canais de sódio dependente de voltagem, inibição dos canais de cálcio, abertura dos canais de potássio, aumento do ácido gama-aminobutírico (GABA) mediando inibição no cérebro, a inibição da função excitatória do glutamato ou alteração das vias de sinalização intracelular.(14)

Geralmente os FAE's possuem atividade de amplo espectro clínico e frequentemente exercem uma ação em mais de um alvo molecular. Novas evidências sugerem que o receptor e as subunidades dependentes de voltagem são modificados por crises crônicas. Assim, as tentativas de entender a relação entre o alvo e o efeito continuarão a fornecer informações importantes sobre a neuropatologia das redes epiléticas e facilitarão o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da epilepsia refratária.(12, 14)

1.1.2 Epilepsias *in vitro*

A utilização de modelos experimentais tem contribuído, enormemente, tanto para conhecimento de importantes processos celulares e moleculares, que podem estar envolvidos na geração, sustentação e término das crises epiléticas, quanto no conhecimento acerca da funcionalidade cerebral normal.(8)

Os modelos experimentais são valiosas ferramentas na epileptologia, favorece o controle das condições ambientais, a análise independente de parâmetros, o controle da uniformidade genética, o controle das concentrações

iônicas e de drogas, devido à ausência da barreira hematoencefálica, entre outras.(6, 8)

Os estudos *in vitro*, principalmente as preparações de fatias de cérebro (com espessura entre 200-600 μM), se constitui como uma das formas mais comumente empregadas. Essa forma de preparação tem como principal vantagem à acessibilidade a muitas propriedades do tecido que seriam difíceis de mensurar *in vivo*.(9)

Além disso, as fatias são espessas o bastante para preservar a circuitaria de uma área específica do cérebro. Portanto, a espessura congrega dois aspectos essenciais: a necessidade de se manter uma circuitaria neuronal intacta e preservar a viabilidade do tecido. Essa técnica favorece o estudo das propriedades eletrofisiológicas dos neurônios como também de uma população neuronal.(6, 9)

Uma das regiões do sistema nervoso central que melhor ilustra todos os aspectos supracitados das preparações *in vitro* é o hipocampo. A orientação regular e a organização lamelar de sua estrutura permitem a manutenção de muitas conexões nas preparações. Não bastasse sua citoarquitetura favorável, o hipocampo ainda é implicado como um dos principais sítios envolvidos no processo de epileptogênese.(15)

As células granulares do giro dentado não têm sido encontradas participar na epileptogênese espontânea ou evocada *in vivo* e *in vitro*, baseado em registros intracelulares com picrotoxina, pentilenotetrazol, penicilina e baixo cloreto.(16) Com base nestes estudos, parece que o giro dentado não expressa *bursts* endógenos e é muito resistente a expressão de atividade epileptiforme síncrona.(17, 18)

1.2 MODELO DE ATIVIDADES EPILEPTIFORMES NÃO-SINÁPTICAS

A atividade de campo extracelular pode estar associada com os potenciais de ação (eventos registrados intracelularmente). Uma correlação intracelular das descargas epileptiformes no córtex e hipocampo é o *burst* que tem sido denominado uma mudança de despolarização paroxística (PDS). O PDS é geralmente aceito ser um breve, aumento da frequência das descargas dos potenciais de ação iniciados por uma lenta despolarização da membrana. Estes *bursts* têm características de PDS, mas sem evidência de sincronização.(18) (19)

Provavelmente estes *bursts* celulares são mediados por mecanismo endógenos dentro das células granulares. Uma característica dos *bursts* endógenos é que eles são dependentes de voltagem, eles aumentam a frequência quando a célula é despolarizada e diminuem a frequência quando a célula é hiperpolarizada.(20)

Os eventos epileptiformes na região do giro dentado apresentam atividades neuronais síncronas com maiores durações e amplitudes, sob condições experimentais de alta concentração extracelular de K^+ e baixa concentração de Ca^{++} . (FIGURA 1). É necessária uma elevação do potássio extracelular *in vitro*, para elucidar as descargas tipo crise.(19)

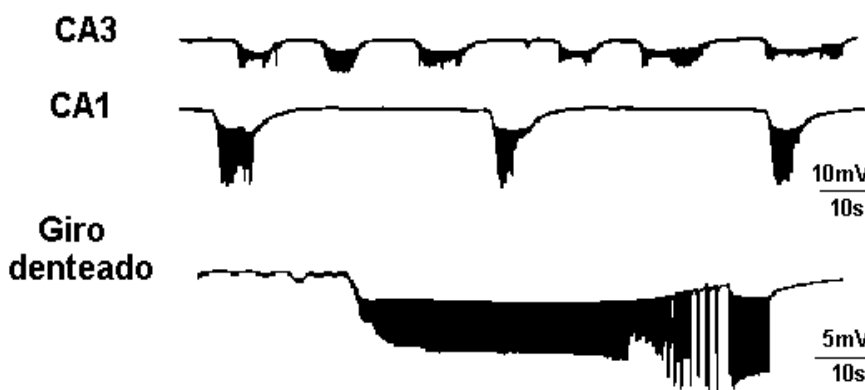


Figura 1 Registro de eventos epileptiformes não-sinápticos (salva de espículas formadas por potenciais de ação síncronos, denominadas *population spikes*, após um deslocamento negativo da linha de base) característicos das regiões do hipocampo, após perfusão ACSF $0-Ca^{++} + [K^+]$. Na região CA1, eventos epileptiformes, os *bursts* apresentam *population spikes* (PS's) com grandes amplitudes, na região CA3, os PS's ocorrem de forma mais estável e com menor intervalo de tempo entre os eventos. E no GD, há atividade neuronal intensa, com variação negativa da linha de base seguida de PS's de grandes amplitudes. Retirado de DUDEK e colaboradores, 1993).

As AE's típica da supressão de conexões sinápticas é caracterizada por uma salva de espículas, formadas pelo disparo simultâneo de potenciais de ação, denominadas de populações de espículas (do inglês *population spike*), superpostas a um deslocamento negativo lento da linha de base (FIGURA 2).(21, 22)



Figura 2 Características dos *bursts* da região do giro dentado. Exemplo de uma seqüência de *bursts* encontrados neste trabalho Durante as atividades epileptiformes induzidas através do protocolo experimental alto- K^+ (8 mM) e zero- Ca^{++} adicionado, *burst* é caracterizado por um deslocamento lento e negativo do potencial extracelular, em nível DC, simultâneo com a ocorrência de uma seqüência de atividades de alta frequência, os *PS's*.

Os *population spikes* com amplitude entre 20 a 40 mV são em parte um reflexo do número de células granulares sincronicamente ativas. Provavelmente representam a ativação de uma grande porcentagem ou toda da camada granular. O início destes paroxismos das células granulares é um passo importante para a propagação das crises dentro e através do hipocampo.(23)

A indução de atividades epileptiformes (AE's), em fatias de hipocampo de ratos na camada granular do giro dentado, nos quais os íons Ca^{++} são retirados do líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF) do tecido, mostram a importância das comunicações neuronais não-sinápticas sobre as crises epiléticas.(21, 22, 24)

1.3 MECANISMOS NÃO-SINÁPTICOS

Vários mecanismos estão por trás das interações não-sinápticas, incluindo interações eletrotônicas mediadas por *gap* ou interações efápticas(22, 25) e mudanças extracelulares dos íon(26). Estes desempenham um papel na iniciação e propagação de descargas tipo crise.

A sincronização dos *bursts* pode ocorrer por acoplamento eletrotônico através das *gap junctions*.(26) As *gap junctions* tem sido demonstradas existir no giro dentado e tem sido proposto produzir pequenos potenciais despolarizantes.

Contudo o número de conexões neuronais através de *gap junctions* no hipocampo parece ser pequeno e pouco provável para explicar a sincronização extensiva.(26)

Íons extracelulares também têm sido propostos desempenhar um papel na sincronização das descargas neuronais. Certamente, um aumento do potássio

extracelular pode causar uma despolarização da membrana celular e pode ter um papel importante na regulação da excitabilidade neuronal.(27)

A interação entre os neurônios pode ser mediada pelo fluxo de correntes transmembranas através do meio extracelular, este processo é denominado de efeito de campo. Mas esses não parecem ser suficientes para sustentar as descargas epileptiformes.(28)

Aumento da excitabilidade e sincronização da atividade neuronal são ambos importantes na epileptogênese. Embora muitos estudos concentram-se em mecanismos sinápticos de sincronização, interação não-sináptica também pode ser parte integrante desse processo. Interações não-sinápticas podem sincronizar atividade neuronal como resultado da alteração no microambiente iônico e efeitos de campo elétrico.(26, 28, 29)

O tamanho do espaço extracelular parece fundamental para modular estes mecanismos não-sinápticos de sincronização. Diminuindo o espaço extracelular devem aumentar as flutuações iônicas exageradamente, como o aumento da concentração de potássio extracelular que resulta em aumento da atividade neuronal.(30)

A redução do espaço extracelular também aproxima os neurônios fisicamente e aumenta a resistência extracelular, aumentando assim os efeitos de campo elétrico pelo maior direcionamento das correntes nas proximidades das membranas neuronais. Portanto, reduzir o tamanho do espaço extracelular aumenta mecanismos não-sinápticos de sincronização.(31)

A região do giro dentado é resistente a atividade epileptiforme não-sináptica quando comparada com a área de CA1. O espaço extracelular em CA1 é menor (12%) e maior no giro dentado (15%), assim proporciona uma possível explicação para a propensão de *bursts* no baixo $[Ca^{++}]$ entre as duas regiões.(15)

A capacidade, de cada região em gerar ou sustentar a atividade epileptiforme não-sináptica depende das circunstâncias, mais especificamente sobre o nível de redução de cálcio e aumento do potássio. Uma condição que favorece o surgimento e a sincronização de atividades epileptiformes no giro dentado é o aumento de potássio no meio extracelular e zero Ca^{++} , nesta situação as células granulares tem a capacidade de gerar *bursts* endógenos.(19, 32, 33)

Os primeiros estudos visando medir as mudanças do espaço extracelular no hipocampo e neocórtex forneceu evidências fisiológicas de que o espaço

extracelular no hipocampo é particularmente pequeno.(34-36) McBain e colaboradores (1990) mostrou que a fração de volume extracelular foi de aproximadamente 0,12 na área CA1 em comparação a 0,18 ou maior em outras áreas do cérebro.

Traynelis e colaboradores (1988) mostraram que a resistência do tecido a crise na área CA1 aumentou no início da alta $[K^+]_o$. Eles também mostraram que as soluções de banho feitas com solutos hiperosmolar impermeáveis bloqueia atividade tipo crise induzida com alta $[K^+]_o$ em CA1.(37)

1.3.1 Papel das gaps junctions e influências do pH

O possível papel das *gaps junctions* na modulação do pH intracelular foi testado através de bloqueadores de *gap junctions* (*carbenexolona*, *octanol* e *oleamida*). Estes suprimiram a atividade epileptiforme reversivelmente, de maneira similar ao pH 7.0. Estes achados são consistentes com a hipótese de que as *gap junctions* são importantes na sincronização dos *bursts* e estes são modulados pelo pH. Octanol tem sido utilizado para bloquear as *gaps* em muitos sistemas e é eficaz neste estudo, mas esta ação pode ser inespecífica. Pode atuar pelo menos via acidificação. Visto que as *gap junctions* são moduladas pelo pH intracelular, isto deve ser consistente com a proposta do papel das *gap junctions* na sincronização dos *bursts*.(38)

Os autores examinaram o papel do pH na regulação da sincronização dos *bursts* no modelo do zero cálcio e alto potássio. pH afeta muitos processos fisiológicos que pode estar envolvido na sincronização não-sináptica, potencialmente incluindo a regulação do volume celular, vias de comunicação intercelular não-sináptica (como as *gap junctions*), ou a sinalização do cálcio. O papel das *gaps* na sincronização dos *bursts* tem sido examinado usando medidas quantitativas nas alterações do pH intracelular em CA1. O pH extracelular foi alterado pelas mudanças na concentração de $NaHCO_3$. O aumento do pH de 7.3 para 7.6 aumentou a amplitude dos *population spikes* enquanto a diminuição do pH de 7.3 para 7.0 diminuiu os *population spikes* (figura 3).(38)

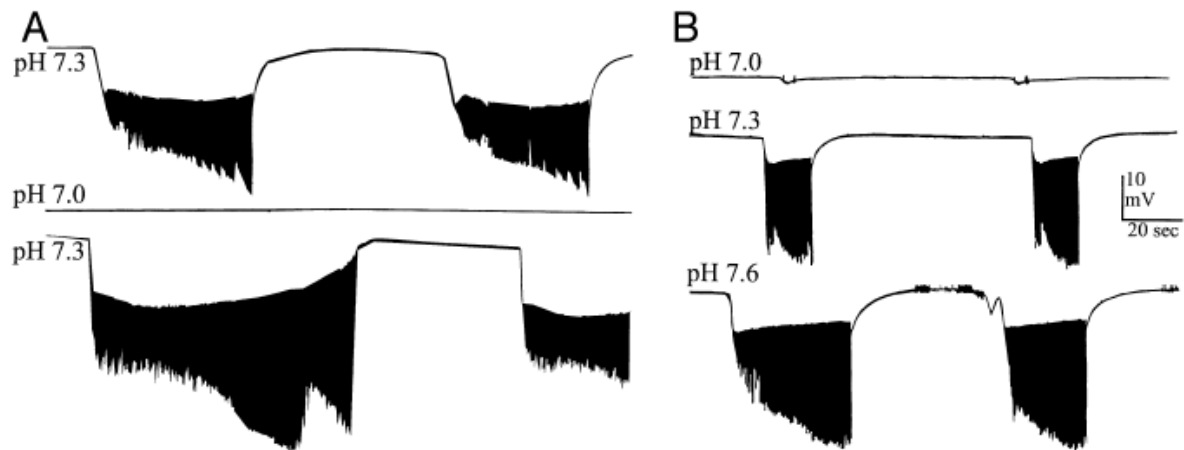


Figura 3 Efeitos do pH_o em bursts prolongados na camada granular do giro dentado. A: aparecimento de *bursts* com ACSF 0- Ca^{++} e 9 mM $[K^+]_o$ (pH 7,3); solução de perfusão com baixo pH 7,0 com supressão dos *bursts*. Após uma hora o pH retornou para 7,3 os *bursts* reapareceram com grande amplitude. B: um diferente *slice* foi primeiramente exposto ACSF 0-Ca + 9 mM $[K^+]$ em pH 7,3 os *bursts* apareceram; a perfusão de solução foi alterada em cima com pH 7,0, no meio pH 7,3 e abaixo pH 7,6. Retirado de Schweitzer e colaboradores, 2000.

Íon H^+ é regulador de inúmeros processos fisiológicos, este tem uma relação entre epilepsia e atividade epileptiforme. Os efeitos da $[H^+]$ no mecanismo de propagação e sincronização, exceto na transmissão sináptica clássica, não tem sido completamente caracterizados. Efeitos da $[H^+]_o$ no fenômeno dos eventos tipo crise tem sido atribuídos algumas vezes a modulação dos canais NMDA controlados pelo Ca (sensíveis a $[H^+]_o$). O modelo utilizado pelos autores é baseado nas alterações das $[K^+]$ e $[Ca^{++}]$ no ambiente extracelular, mensurados durante a crise. Durante a atividade tipo crise os neurônios acumulam H^+ , resultando na acidificação do espaço intracelular. O pH do espaço extracelular também diminui durante a crise, após as mudanças alcalinas. Mudanças no pH associadas as atividades neuronais serve como local de sinais de feedback. Existem alguns estudos analisando a interação do pH extracelular com a atividade epileptiforme, mas dados correlacionando o pH intracelular e atividade neuronal são faltantes.(38)

Os *bursts* foram associados com uma acidificação intracelular, atingindo valores mais baixos no final de cada evento. Após a terminação do *burst*, o pH intracelular recuperou-se lentamente (figura 4).

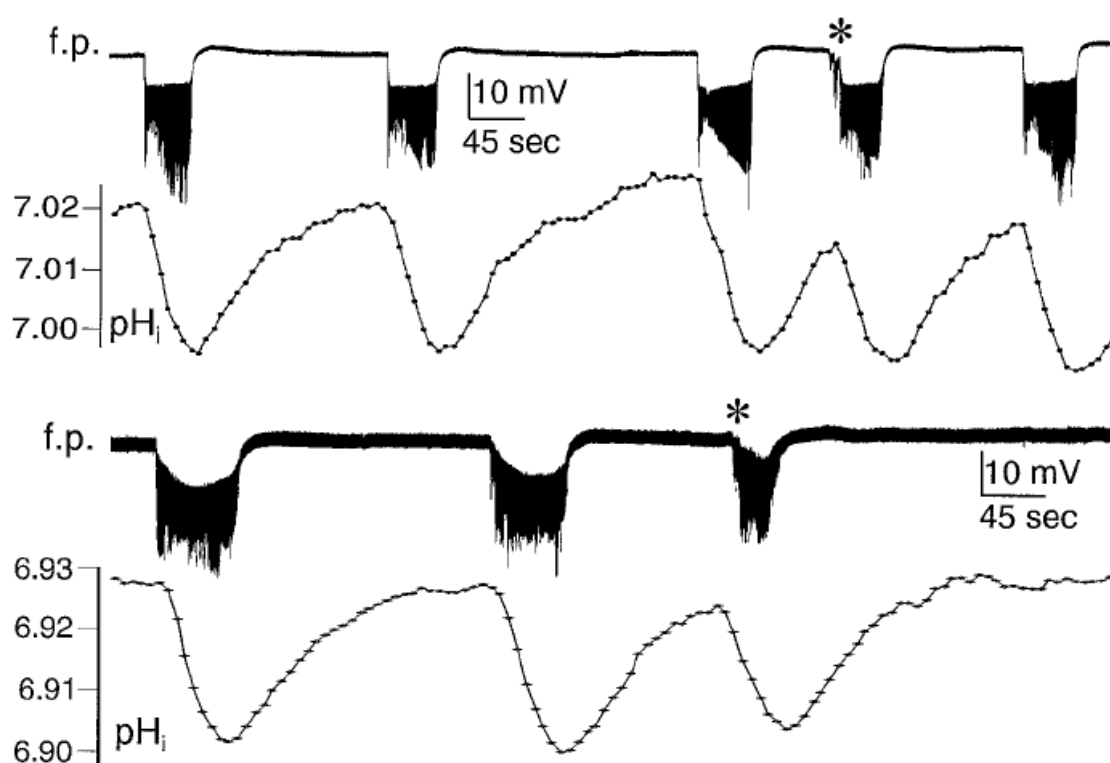


Figura 4 A duração dos *bursts* espontâneos se correlaciona com a acidificação do pH_i. Em algumas fatias do cérebro (20%), potenciais de campo espontâneos começam antes do pH_i ter se recuperado. Dois exemplos representativos são mostrados (marcados com *). Nestes casos, duração do *burst* foi sempre menor. Retirado de Xiong e colaboradores, 2000.

Quando o pH_i diminui a certos valores, os *bursts* param. A recuperação de determinados valores coincide com o início do próximo *burst*. Em alguns *slices* (20%), contudo, ocasionalmente os *bursts* espontâneos iniciam antes do pH_i ter retornado a níveis esperados. Nestas instâncias a duração do próximo *burst* foi menor que a do anterior como nos *bursts* espontâneos (figura6). Isto sugere que atingir determinados níveis de acidificação intracelular está correlacionado com o término do *burst*.(38-40)

Os *bursts* das células granulares do giro dentado foram associados com acidificação intracelular. Após o término do *burst* o pH intracelular foi retornando lentamente. Os dados também mostram uma relação entre os níveis de acidificação intracelular e a duração dos *bursts*. Isto representa que a acidificação em certos níveis resulta na terminação das descargas epileptiformes. Estudos prévios têm sugerido possíveis mecanismos envolvidos no término da crise. Um possível mecanismo é que a elevação do potássio leva uma despolarização bloqueando a geração de *spikes* nos neurônios. Alternativamente, a excitabilidade neuronal

pode ser bloqueada pelo aumento da atividade da bomba de Na^+/K^+ ATPase. Existem evidências que mudanças no potássio extracelular podem estar envolvidas no início da crise, mas no término da crise, ou na determinação da duração da crise, não parece estar diretamente relacionadas com os níveis de potássio extracelular. Outro candidato é a inativação dos canais de sódio.(38, 39)

No presente estudo, a acidificação intracelular pode ser uma força de restrição importante para impedir a atividade neuronal de alcançar níveis que ameaçam a integridade da função cerebral normal. Além disso, estes dados sugerem que a modulação da homeostase do pH podem oferecer novas oportunidades terapêuticas clinicamente para epilepsia refratária. Quando pH_i atinge um certo limiar, ele desabilita os processos celulares que são necessários para um funcionamento contínuo do disparo neuronal.(39)

1.4 CONTROLE DA HOMEOSTASE DO CLORETO NO MEIO INTRA E EXTRACELULAR

Homeostase do cloreto é mantida por vários tipos de canais, trocadores, bombas e transportadores de Cl^- . Possivelmente um ou mais deles poderia mediar à diminuição rápida da concentração intracelular de cloreto. A figura 5 mostra o efeito de diferentes inibidores dos fluxos de cloreto.

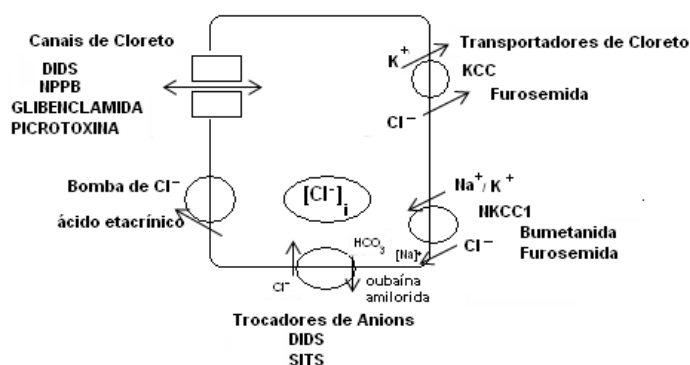


Figura 5 Esquema ilustrativo da Homeostase do cloreto. Em condições normais trocadores, bombas, canais iônicos e transportadores (NKCC1 e KCC2) são responsáveis pela manutenção do equilíbrio neuronal do cloreto.

A sinalização elétrica em neurônios e células gliais é baseada na atividade de bombas iônicas e carreadores que estabelecem gradientes iônicos transmembrana, e sobre o funcionamento de canais iônicos, que geram resposta de corrente e

voltagem com base na eletrodifusão.

1.4.1 Canais de cloreto do tipo dependente de voltagem

Os canais aniônicos são permeáveis a todos os ânions haletos. O potencial reverso do Brometo (Br^-), Iodeto (I^-), e nitrato (NO_3^-) são positivos e aumentam nesta ordem (Tabela 1). Estes íons têm uma permeabilidade maior que o Cloreto (Cl^-). (41)

Potenciais reversos indicam que o canal de cloreto seleciona os íons haletos, conforme a sequência: $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ na proporção 1.98:1.46:1:0.44. Após a inclusão dos outros ânions, a sequência da seletividade alterou: $\text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Benzoato}^- > \text{Br}^- > \text{SCN}^- > \text{Cl}^- > \text{acetato}^- > \text{propionato}^- > \text{F}^- > \text{aspartato}^- > \text{glutamato}^- > \text{SO}_4^{2-}$. (41, 42)

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

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

Observação: ΔE_{rev} =mudanças no potencial reverso; P_{test}/P_{Cl} =proporções de permeabilidade.
Fonte: Robison e Stokes, 1959.

As proteínas CIC são ambas expressas em procariotos e eucariotos e tem papel crucial no transporte do cloreto, regulação do volume celular, acidificação organelas, e excitabilidade da membrana. (43, 44)

A família dos canais de cloreto dependentes de voltagem é expressa em níveis significativos no cérebro, inclui as subunidades CIC-2, CIC-3, CIC-4, CIC-5, CIC-6 e CIC-7. (45) Somente CIC-2 tem se expressado em neurônios e ativado em potenciais de membrana de repouso. No entanto, é possível que os outros membros

da família de CIC contribuem para este processo. CIC-2 pode ser ativado por hiperpolarização e acidificação extracelular. A subunidade CIC-2 é também ativada pelo inchaço da célula induzido pela hipotonicidade, Isto sugere que CIC-2 pode estar envolvido na diminuição da regulação do volume. A diminuição do pH extracelular também ativa CIC-2, quando expressos em oócitos ou em células de mamíferos.(46-48) Ele pode ser fechado pelo aumento do pH extracelular acima de 7,4, sugerindo que o pH extracelular é um importante regulador fisiológico deste canal. É altamente expressado em células piramidais do hipocampo e células de Purkinje no cerebelo e menos abundante em outros neurônios e glia.(49) A seqüência de seletividade do CIC-2 aos haletos é $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$. Isto se aplica tanto à condutância e a seqüência de permeabilidade. Este é pouco inibido por 1 mM DIDS (ácido 4,4-diisotiocinatoestilbeno-2,2-disulfônico), moderadamente por 1 mM 9-AC(9-antraceno) ou difenilcarboxilato, e um pouco mais eficientemente por ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzóico (NPPB). Bloqueadores de canais de cloreto dependentes de voltagem como DIDS (ácido 4,4-diisotiocinatoestilbeno-2,2-disulfônico) e SITS (ácido 4-acetamido-4-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfônico ácido), modulam canais aniônicos e transportadores de atividade e em ambos o mecanismo é irreversível. (50-52) DIDS e NPPB suprimiram a atividade epileptiforme não- sináptica no estudo de Bikson e colaboradores (1999). Cádmio (Cd^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) também inibem CIC-2. Contudo nenhum bloqueador é específico para um tipo de CIC (tabela 4).(49) A ativação de CIC-2 por $[\text{Cl}]_i$ tem sido vista em neurônios hipocampais, pode ser importante para prevenir a acumulação de cloreto no meio intracelular, como pode ocorrer em particular durante um aumento de frequência na atividade neuronal.(53)

Tabela 2 Farmacologia dos canais de cloreto

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

Observação: Inibidores de canais de cloreto. ++, $IC_{50} \leq 5 \mu M$; +, $5 \mu M < IC_{50} \leq 100 \mu M$; o, $100 \mu M < IC_{50} \leq 2 \text{ mM}$; -, $IC_{50} > 2 \text{ mM}$; DPC, difenilaminocarboxilato; NPPB, ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzóico; FFA, ácido flufenâmico; NFA, ácido niflúmico; 9-AC, 9-antracencarboxilato; IAA, ácido indaniloxiacético; CPP, ácido 2-(p-fenoxicloro) propiônico; DIDS, ácido 4,4-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfônico; SITS, ácido 4-acetamido-4-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfônico ácido, DNDS, ácido 4,4'-dinitro-estilbeno-2,2'-disulfônico. * Potência com aplicação extracelular/ intracelular
Fonte: Jentsch e colaboradores, 2002.

1.4.2 Cotransportadores de cátion-cloreto (CCCs)

O tráfego de íons através de membranas biológicas é mediado por canais e transportadores, e estes dois tipos de moléculas formam a base da sinalização elétrica no sistema nervoso. Entretanto, o volume de pesquisa sobre canais voltagem e ligante-dependentes é muita vezes maior do que aquela sobre o estudo dos transportadores de íons neuronais. Este viés não tem nenhum fundamento racional: não reflete uma diferença no impacto ou versatilidade das funções destas moléculas. O que é geralmente ignorado é que os transportadores iônicos são tão importantes quanto os canais na geração dos sinais elétricos.(43)

As proteínas CCC são glicoproteínas com pesos moleculares aparentes de 120-200 kDa. Sete de nove CCCs descritas até agora são transportadores iônicos de membrana (Gambá, Mercado, Payne) e em termos de função caem em três categorias: dois membros são co-transportadores $Na^+K^+2Cl^-$ (NKCCs; isoformas NKCC1 e NKCC2), um membro é cotransportador Na^+Cl^- (NCC), e quatro membros são cotransportadores K^+Cl^- (KCCs, isoformas KCC1-4).(54)

A família CCC nos mamíferos é constituída de nove membros codificados pelos genes *Slc12a1-9*, dois cotransportadores $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ sensíveis a diuréticos da alça e 4 cotransportadores de $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ (KCC1-4). NKCC2 e KCC1 são cotransportadores renais específicos. Os restantes cotransportadores são mais amplamente expressos e são encontrados no sistema nervoso central. A localização celular precisa do KCC1, KCC3 e KCC4 ainda não foi relatada no cérebro. NKCC1 tem sido relatado no plexo coróide, oligodendrócitos, e neurônios, considerando que a expressão do KCC2 tem se mostrado restrita aos neurônios. Estes dois cátion- Cl^- cotransportadores funcionam em direções opostas, afetam a neurotransmissão GABAérgica e glicinérgica através da regulação dos níveis de cloro intracelular. Dependendo da concentração intracelular de cloreto na célula, Cl^- despolariza ou hiperpolariza a membrana plasmática. (55) Dois estudos recentes tem examinado a concentração de cloreto intracelular nos neurônios durante o desenvolvimento, com a técnica de *patch clamp* perfurado com gramicidina. Ambos os estudos tem relatado uma diminuição da concentração de Cl^- durante o desenvolvimento pós-natal. No estudo de Rivera e colaboradores, utilizaram oligonucleotídeos antisensos para KCC2, encontraram uma diminuição nos níveis de expressão de KCC2 em *slices* de hipocampo de 11-13 dias pós-natal e demonstraram uma mudança positiva do potencial reverso do GABA/ Cl^- , apoiam a visão que a extrusão do cloreto é através do KCC2. Assim KCC2 constitui mecanismo de bombeamento de cloreto responsável pela hiperpolarização através do influxo de cloro após a ativação de receptores GABA_A nos neurônios maduros.(55, 56)

Acredita-se que geralmente a corrente de despolarização atual é mediada pelo movimento passivo de íons HCO_3^- através dos receptores GABA_A/canal de cloro. A permeabilidade dos receptores GABA_A para HCO_3^- é aproximadamente de 1/5 para Cl^- . A participação de HCO_3^- nas correntes de GABA é difícil de estimar, na presença de uma força motriz de Cl^- . Foi levantada a hipótese, no entanto, que sob uma estimulação prolongada, os colapsos de gradiente de cloreto e do gradiente de HCO_3^- permanecem intactos. Na ausência de um gradiente de cloreto, GABA desencadeia um efluxo de HCO_3^- e despolariza a membrana.(57)

Estimulação dos receptores do tipo GABA_A induz entrada de Cl^- para dentro da célula. Nas condições normais, este Cl^- pode ser expulso por meio de um cotransportador. Com a estimulação de alta frequência, no entanto, o cotransportador $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ pode ser a limitação de taxa e cloreto poderiam se acumular

nos neurônios e dissipar a força motriz. Além disso, foi proposto que a estimulação repetida, pode elevar a concentração extracelular K^+ , suficiente para reverter a força motriz para cotransporte K^+-Cl^- . (55)

Com exceção do NKCC2 e do NCC, que são predominantemente encontrados nos rins, todos os CCCs são expressos em células neuronais ou gliais – ou ambas – pelo menos em algum ponto do desenvolvimento do SNC. O KCC1 é considerado uma isoforma que “mantém a casa em ordem” em vários tipos celulares, incluindo células gliais, mas os dados atuais sugerem pouca ou nenhuma expressão em neurônios centrais. (58, 59) Em contraste, o KCC2 é um CCC excepcional, já que é expresso exclusivamente em neurônios do SNC ³³. Surpreendentemente, há poucos trabalhos sobre o KCC3 apesar de sua presença em várias regiões cerebrais.(59, 60) Interessantemente, os níveis da proteína KCC3 mostram um aumento que é similar ao aumento extensivo estudado do KCC2, um tópico que será discutido em detalhe abaixo. Sabe-se menos ainda sobre o papel do KCC4 no sistema nervoso, isoforma que é expressa em altos níveis no cérebro embrionário³⁷. Outro CCC que tem atraído interesse considerável entre os neurobiologistas é o NKCC1.(43)

O KCC2 é localizado na membrana plasmática do soma e dos dendritos em várias regiões encefálicas, por ex. células granulares cerebelares, células talâmicas, neurônios auditivos do tronco e neurônios corticais.(43)

Evidências funcionais indicam que o NKCC1 é expresso em axônios.(43) A co-expressão de NKCC1 e KCC2 em neurônios específicos que é evidente com base em dados estruturais e funcionais(61) indica um controle rígido do $[Cl^-]_i$ que pode resultar na geração de gradientes intraneuronais de Cl^- (Figura 6).

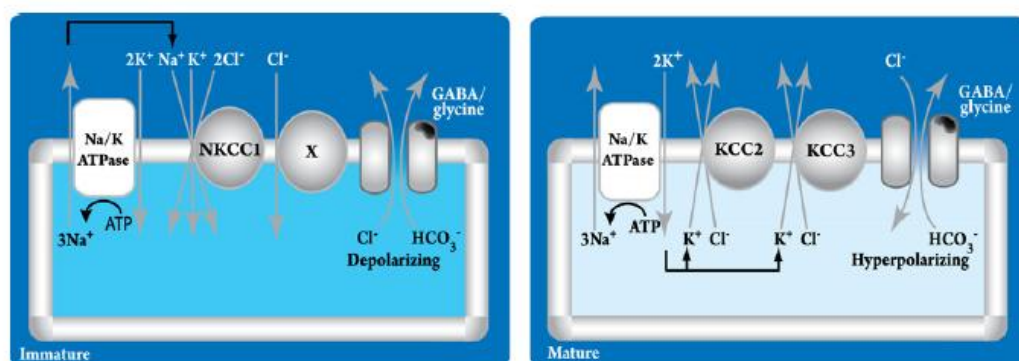


Figura 6 Mecanismos de transporte por trás das respostas mediadas por receptores GABA_A e glicina em neurônios imaturos e maduros. (esquerda) NKCC1 media captação de Cl⁻ em neurônios hipocâmpais e corticais adultos, enquanto um transportador de Cl⁻ ainda não identificado, chamado de X, opera em alguns neurônios, tanto em paralelo com NKCC1 como em sua ausência. (Direita) em neurônios maduros do SNC, o KCC2 é o principal co-transportador K-Cl e é freqüentemente co-expresso com KCC3. o transporte de Cl⁻ por todos CCCs é abastecido pelos gradientes de Na⁺ e K⁺ gerados pela Na-K ATPase. Como a concentração intracelular de Cl⁻ é alta em neurônios imaturos (indicado pela sombra do azul) E_{GABA-A} e E_{Gly} não são diretamente afetados pela concentração intracelular de HCO₃⁻, ao passo que em neurônios maduros, o efluxo de rede de HCO₃⁻ mediado por canais pode ter um grande efeito nos potenciais reversos. Retirado de Blaesse e colaboradores, 2009.

Outros estudos tem mostrado que a expressão de NKCC e KCC varia com o desenvolvimento de acordo com as respostas GABAérgicas e com o desenvolvimento diminui a concentração intracelular de cloreto. Expressão de NKCC em neurônios granulares está aumentada no nascimento e depois diminui rapidamente, atingindo níveis muito baixos de expressão dentro de 1 a 2 semanas. Em contraste ao NKCC1, a expressão de KCC2 é baixa no nascimento e aumenta durante o desenvolvimento pós-natal.(55) Como indica a figura 7, a super regulação de KCC2 e uma baixa regulação de NKCC1 são consistentes com a diminuição significativa no Cl⁻ intracelular observada durante o desenvolvimento pós-natal. Esta mudança na força motriz de Cl⁻ é responsável pela mudança na direção e natureza das correntes GABA e glicina, que ocorrem durante o mesmo período. Assim parece haver uma correlação forte entre a expressão de cotransportadores cátion-cloreto e alteração dos níveis intracelulares de cloreto durante o desenvolvimento. No entanto, se os cotransportadores participam da regulação intracelular de cloreto nos neurônios ficou demonstrada ser funcionante. Evidências farmacológicas recentes, suportam que o papel do cotransporte (NKCC1) Na⁺ e K⁺ sensível ao acúmulo de cloreto, a exposição a baixa concentração de bumetanida leva a um colapso do gradiente de cloreto, este funciona como inibidor do cotransporte Na⁺-K⁺-Cl⁻.(62)

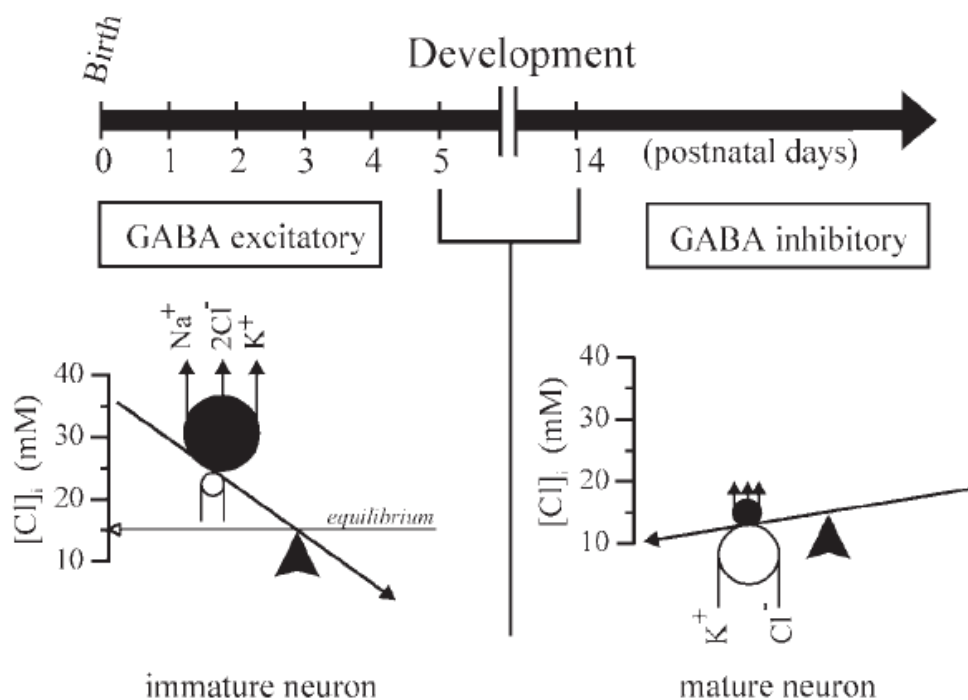


Figura 7 Regulação do desenvolvimento da expressão de NKCC1 e KCC2 coincide com as mudanças de GABA induzida por correntes de Cl^- despolarizantes (excitatório) para hiperpolarizantes (inibitória). Durante a vida embrionária precoce e tardia pós-natal, os neurônios imaturos expressam o cotransportador $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$. A presença do cotransportador $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ se correlaciona com alta $[\text{Cl}]_i$ nesses neurônios. Na maturação, há uma diminuição da expressão cotransportador $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ e um aumento na expressão do cotransportador $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$. Estas mudanças coincidem com uma diminuição na $[\text{Cl}]_i$. (Retirado de Delpire e colaboradores, 2000; Adaptado de Lu et al, 1999).

O trabalho pioneiro sobre o papel do cotransporte $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ na transmissão GABAérgica hiperpolarizante convencional foi feito em preparações com crustáceos e neurônios corticais de mamíferos.(63) Em neurônios, E_K é mais negativo do que o potencial de repouso (V_m), o que permite que o cotransporte $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ dê suporte aos PIPS hiperpolarizantes convencionais (quando o KCC está próximo ao equilíbrio, o E_{Cl} está próximo a E_K). Entretanto, a permeabilidade a HCO_3^- dos receptores GABA implica em $E_{\text{GABA-A}} > E_{\text{Cl}}$, e assim a extrusão ativa de Cl^- é uma condição necessária mas não suficiente para as respostas hiperpolarizantes GABA_A . Na maioria dos neurônios centrais estudados até agora, o principal extrusor de cloreto é o KCC2, mas em alguns neurônios o KCC3 parece ter um papel significativo em ajustar o $E_{\text{GABA-A}}$.(58)

O NKCC1 parece ser o principal responsável pelo mecanismo de captação de Cl^- pelas correntes despolarizantes mediadas por GABA e mediadas por receptores

pós-sinápticos e extra-sinápticos em neurônios hipocampais e neocorticais em desenvolvimento.(61)

Com respeito a sua fonte de energia, os transportadores iônicos caem em duas categorias: transportadores ativos primários são abastecidos diretamente por ATP, enquanto que transportadores ativos secundários tiram a energia para o transporte do íon do gradiente eletroquímico de outras espécies iônicas. O transportador iônico primário ubíquo, a $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase, gera gradientes de membrana de K^+ e Na^+ que fornecem a principal fonte de energia para a maioria dos transportadores ativos secundários, incluindo todos os CCCs (Fig 6). A extrusão de Cl^- pelo cotransportador $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ mediado pelo KCC é dirigida pelo gradiente de K^+ , enquanto que a captação de Cl^- em muitos (mas não todos; ex: neurônios é dirigida pelo NKCC1 que explora o gradiente de membrana do Na^+ como sua fonte de energia para o cotransportador de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$. O cotransportador KCC2 opera próximo ao equilíbrio, o que permite a maximização da eficiência de coletar energia do gradiente de K^+ para abastecer a extrusão do Cl^- .(43)

Uma das principais funções dos CCCs é manter uma $[\text{Cl}^-]_i$ constante frente aos fluxos mediados por canais que tendem a dissipar o gradiente eletroquímico transmembrana do Cl^- , por exemplo, a força das correntes de Cl^- mediadas por receptores GABA_A . A $[\text{Cl}^-]_i$ também é afetada pelos transportadores iônicos ativos dependentes de cloreto envolvidos na regulação neuronal de HCO_3^-/pH .(64) O trocador Cl/HCO_3 independente de sódio AE3 pode funcionar como um mecanismo de captura de Cl^- significativo nos neurônios, e em alguns neurônios pode representar o transportador X na figura 6. Além do seu papel na homeostase do Cl^- neuronal, o HCO_3^- funciona como um carregador significativo de corrente despolarizante pelos receptores GABA_A .(63) Isso se deve à regulação do pH, que leva a um nível de HCO_3 intracelular mais alto do que seria esperado com base em uma distribuição passiva.

1.4.3 Farmacologia dos CCCs e seletividade dos íons

O sítio de transporte do sódio pelos CCCs pode aceitar Na^+ ou Li^+ e o sítio de transporte de K^+ podem aceitar K^+ , Rb^+ , NH_4^+ ou Cs^+ , embora com diferenças de afinidades significativas aparentes. A substituição completa de K^+ intracelular por Cs^+ inibe o efluxo de Cl^- através do KCC2, e os dados disponíveis indicam uma

seqüência de seletividade $K^+ \sim Rb^+ \gg Cs^+$. Assim, a prática freqüente de uso de Cs^+ em experimentos usando técnica de clampeamento de correntes é obrigatória a interferir na função de KCC2. Quanto aos ânions, apenas Br^- tem se mostrado substituir em parte Cl^- pelo NKCC e KCC.(43)

O sítio para cada um dos íons parece ser bastante específico: K^+ pode ser substituído por Rb^+ , mas não por outros cátions testados, enquanto Cl^- pode ser mal substituído por Br^- mas não por NO_3^- , em contraposição ao sistema de troca Cl^-/OH^- .(54, 65, 66).

1.4.4 CCCs e a bomba de Na^+-K^+ ATPase de membrana

A partir da relação funcional entre a Na^+-K^+ ATPase de membrana e os CCCs (Figura 6) fica imediatamente claro que qualquer fator que tenha um efeito na Na^+-K^+ ATPase terá influência na operação dos CCCs. Isso significa que ligantes endógenos (ex- ouabaína e agrinas endógenas) que regulam as isoformas neuronais da Na^+-K^+ ATPase também afetarão as funções dos CCCs. Além disso, manipulações que levam a funções alteradas de KCC ou NKCCs também podem refletir uma mudança na função da Na^+-K^+ ATPase.(43)

1.4.5 CCCs e Epilepsia

Enquanto a maioria (~70%) das epilepsias é idiopática, os casos restantes são atribuídos a doenças cerebrovasculares, lesão cerebral traumática e tumores. Uma diminuição de KCC2 associada com a atividade epileptiforme foi observada em inúmeros estudos *in vivo* e *in vitro* em modelos animais, e este mecanismo pode atuar como um dos links entre lesão neuronal e epilepsia. Em um estudo importante, Miles e colaboradores mostraram que fatias hipocâmpais obtidas de pacientes com epilepsia do lobo temporal geravam atividade interictal que era atribuível à transmissão despolarizante mediada por GABA em uma subpopulação de neurônios principais. Um estudo de acompanhamento mostrou que a despolarização estava relacionada com uma diminuição de KCC2 e que, de maneira interessante, a atividade interictal era bloqueada por bumetanida. As cascatas moleculares que levaram a essa super regulação do KCC2 em vários estados patofisiológicos incluem aquelas mediadas pela sinalização BDNF-TrkB.(67)

A transmissão mediada por GABA não é suprimida em tecido epilético, mas a capacidade de extrusão do Cl^- parece ter um papel chave na susceptibilidade dos neurônios para a atividade epileptiforme. Em camundongos transgênicos, a propensão para a epilepsia *in vivo* e a hiperexcitabilidade *in vitro* é aumentada em uma relação inversa ao nível de expressão de KCC2. A inibição GABAérgica também pode reverter em excitação sem qualquer mudança na expressão funcional dos KCCs, como mencionado acima. De fato, as crises epiléticas são associadas com grandes transientes extracelulares de K^+ , que podem ter um componente GABAérgico. Um aumento patofisiológico na $[\text{K}^+]_o$ pode levar a um círculo vicioso que envolve uma outra despolarização tanto do potencial de membrana quanto de EGABA_A e um inchaço celular que aumenta a sinalização efáptica pró-epilética.(60)

1.4.6 Bloqueadores de CCCs como drogas anticonvulsivantes putativas

Inúmeros estudos examinaram a possível utilidade de drogas diuréticas, especialmente furosemida e bumetanida, no tratamento de distúrbios epiléticos. Enquanto que algumas observações indicam uma ação anticonvulsivante, a interpretação é complicada pela grande diversidade de alvos celulares das drogas dentro e fora do cérebro e, no caso da furosemida, por causa da falta de especificidade em nível molecular.(56) A busca por novas drogas é particularmente importante no caso de crises neonatais, onde os anticonvulsivantes padrões tem pouca eficácia. No momento, a bumetanida atraiu muita atenção como uma droga putativa para suprimir crises em neonatos, uma idéia que é baseada na suposição de que a susceptibilidade as crises é ligada às ações despolarizantes de GABA no encéfalo neonato. Entretanto, os padrões de expressão de KCC2 e as características de desenvolvimento paralelas do EEG humano não sugerem que o GABA poderia despolarizar em excesso no córtex do neonato a termo, mas a situação é provavelmente diferente para neonatos pré-termo. Além disso, trabalhos *in vitro* resultaram em dados conflitantes acerca das propriedades anticonvulsivantes da bumetanida. Claramente, é necessária muita pesquisa para testar a hipótese de uma conexão de ações despolarizantes de GABA não-patológicas com a geração de crises em neonatos e suas possíveis implicações clínicas.(56)

Investigações foram realizadas sobre o uso de inibidores cotransportadores, como furosemida e bumetanida, como agentes antiepiléticos. Os estudos,

realizados nas fatias de hipocampo, sugere o bloqueio de NKCC como fundamental para os efeitos antiepilépticos antagonísticos do transporte de cloreto. Este fato foi também confirmado pela simulação computacional.(68) De acordo com essas simulações, a acumulação de Cl^- em espaços intracelulares durante o estado ictal foi mediada pelo cotransportador NKCC, o qual aconteceu com quase o mesmo fluxo durante o estado ictal. O efluxo de Cl^- foi denominado pelo cotransportador KCC e durante o estado ictal este foi sempre menor que o influxo de Cl^- por NKCC. Somente na transição entre o estado ictal/interictal, o efluxo de KCC superou o influxo de NKCC e foi responsável pela diminuição da concentração intracelular de Cl^- . Estes resultados mostram que NKCC como um importante alvo para drogas antiepilépticas e bumetanida tem se destacado por sua adequação. Bumetanida tem aproximadamente uma afinidade 500 vezes maior para NKCC1 (K_i of $\sim 0.1 \mu\text{M}$) que para KCC2 (K_i of $\sim 25\text{-}50 \mu\text{M}$), diferentemente furosemida inibe NKCC1 e KCC2 com potência igual (K_i of $\sim 25\text{-}50 \mu\text{M}$). Portanto, em baixas doses (2-10 μM bumetanida é relativamente um inibidor específico de NKCC1.(43)

O NKCC1 pode ser seletivamente bloqueado por um composto diurético, a bumetanida (1–10 mM), que tem uma afinidade até 500 vezes maior pelo NKCC1 (K_i 0.1 mM) do que por furosemida.(43) A furosemida, outro diurético, bloqueia tanto NKCC1 quanto os KCCs com igual potência, e é freqüentemente usada a 100 mM ou mais para inibir KCC2 em experimentos com culturas neuronais e *slices*. 100 mM não levam a um bloqueio completo, e um fator de confusão óbvio é o efeito simultâneo em NKCC1.(43) Além disso, a furosemida tem efeitos inibitórios nos receptores N-metil D-aspartato (NMDA) e GABA_A .(56) O ácido *dihydroindenylloxy-alkanoic* (DIOA) é outra droga não-específica que tem sido usada extensivamente para bloquear cotransporte K-Cl.

Há dois compostos que inibem cotransporte $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ na faixa micromolar: DIDS e DIOA afetam cotransporte ($\text{K}^+\text{-Cl}^-$) de maneira específica da espécie, têm vários outros alvos e pode afetar a viabilidade celular.(66, 69, 70)

1.5 FÁRMACO BROMETO DE SÓDIO

O uso de brometos nas epilepsias foi uma descoberta de Sir Charles Locock, em 1857. Anteriormente, os sais de brometo foram amplamente utilizados para o tratamento de hepatoesplenomegalia, sífilis e eczemas. Durante 60 anos, o elixir

triplo de brometo (amônio, sódio e potássio) foi amplamente utilizado no tratamento das epilepsias com sucesso.(71-77)

Mais tarde, com a descoberta de novas substâncias antiepilépticas, os brometos caíram em desuso e as experiências terapêuticas foram relatadas ocasionalmente.(71, 78)

Boenigk e colaboradores (1985) relataram resultados positivos com o tratamento alternativo de brometos para epilepsias refratárias na infância com crises tônico-clônicas generalizadas (CTCG). Este tipo de epilepsia geralmente acomete crianças entre 6 meses e 3 anos de idade. Especialmente, se o seu início é durante o primeiro ano de vida, a epilepsia tende a funcionar um curso desfavorável, levando a ataques frequentes e prolongados. Os sintomas focais foram ausentes neste caso, mas principalmente lateralização alternada pode ser observado (epilepsia do tipo grande mal). Paresias pós-ictal e até mesmo déficits neurológicos irreversíveis podem acontecer.(76)

No estudo de Woody e colaboradores (1990) a duração do tratamento com brometos nos 11 pacientes variou 9 a 18 meses. Dois dos pacientes, um com epilepsia fotossensível e um com epilepsia sintomática de localização relacionada, tiveram o completo controle das crises com a adição de brometo no tratamento com valproato. Quatro crianças, duas com síndrome de Lennox-Gastaut e dois com epilepsias sintomáticas de localização-relacionada, teve uma redução de 75 a 95% na freqüência das crises. Três crianças apresentaram melhora transitória (2-4 semanas), enquanto duas crianças (incluindo as crianças com afasia adquirida com epilepsia) não apresentaram melhora. Nos seis pacientes que responderam favoravelmente, a dose efetiva média foi de 33 mg / kg / dia de brometo (variação, 11-50 brometo mg / kg / dia), e a concentração terapêutica média efetiva foi de 14,1 mmol / L.

Mais recentemente, Steinhoff e colaboradores(1992) investigaram a eficácia do Br⁻ em um estudo controlado retrospectivo de 60 pacientes com epilepsia refratária: freqüência CTCG foi reduzida em 50% de 58% dos seus pacientes.

No estudo de Ernst e colaboradores (1988), 36 crianças com epilepsia grave mostraram aspectos novos para o tratamento de epilepsias intratáveis de outra forma com CTCG. Seis dos 19 casos de crianças com crises tônico-clônicas generalizadas não apresentaram mais crises, enquanto outras nove crianças

melhoraram consideravelmente. Geralmente, os níveis totais no sangue de 80 a 110 mg/dl, a dose diária variou entre 50 e 80 mg/kg.

Para o monitoramento do tratamento com brometo, tem de ser considerado o seguinte fator: brometos são rapidamente e completamente absorvidos a partir do trato intestinal. Uma vez que eles não são excretados nas fezes, toda dose administrada é transportada na corrente sanguínea. O íon brometo rapidamente torna-se distribuído em todos os espaços extra e intracelular. Após o início da terapia, aumenta o nível de brometo em um curto período de tempo no corpo, em detrimento do cloreto, que é mais facilmente excretado pelos rins do que o brometo.(74)

A meia-vida plasmática de brometo foi encontrada ser 12 dias. Portanto, o nível sanguíneo não deve ser estimado antes de três semanas após a última alteração na dosagem. Não há evidências de que o brometo induz ou inibe as atividades das enzimas metabolizadoras no fígado, levando a interações metabólicas com outros medicamentos anticonvulsivantes.(75)

Uma vez que o brometo, no entanto, é um depressor central, espera-se aumentar os efeitos depressores de outras drogas antiepilépticas. Assim, os efeitos colaterais observados neste estudo podem ser pelo menos em parte uma consequência do tratamento combinado com primidona e / ou fenobarbital, embora não houvesse indícios de que brometos afetaram os níveis sanguíneos destes medicamentos.(74)

Ernst e colaboradores (1988) recomendam como uma dose ideal 50-80 mg/kg/dl e Br⁻ 80-120 mg/dl, em ótima faixa de nível sérico de Br⁻. Os efeitos tóxicos podem ocorrer quando a concentração sérica for superior a 150 mg / dl.

De acordo com Woody e colaboradores (1980), a fenitoína e a carbamazepina são ineficazes e também podem piorar o quadro clínico. O fenobarbital constitui o tratamento de primeira escolha e ácido valpróico, de segunda escolha. Nos casos que não respondem à medicação, a terapia com brometo ainda pode ser segura e eficaz, utilizada como um adjuvante antiepiléptico em crianças e adolescentes.

Os resultados Ernst e colaboradores (1988) apontam a terapia com Br⁻ com uma opção, em casos de epilepsias com CTCG resistentes à terapia com FAE's de primeira linha, não só nas crianças, mas também em adolescentes e adultos jovens.

Estudo recente num centro de epilepsia na Alemanha investigou a eficácia e tolerância do brometo de potássio em 113 pacientes (1 a 20 anos) com epilepsia

grave e crises tônico-clônicas generalizadas. A dose inicial foi de 45 mg/kg e aumentada para 70 mg/Kg. Dentre estes pacientes 49% não tiveram crises nas últimas quatro semanas do estudo e 31% mostraram uma diminuição maior que 50%.(79)

Efeitos tóxicos encontrados com o uso de brometos foram demência e delírio, podem ocorrer como fazendo parte do bromismo.(72) Bromoderma, prurido, pústulas acneiformes na parte superior do corpo, também podem ocorrer. Como os brometos atravessam facilmente a placenta do feto, hipotonia e depressão neurológica. Isto essencialmente impede o uso de brometo na mulher grávida.(80, 81)

A toxicidade do brometo no paciente com crises pode ocorrer com menos frequência em crianças e adolescentes, pode ser evitado através do monitoramento das concentrações das drogas no sangue.(80)

A maior fração do brometo é encontrada no fluido cérebro espinal (FCE) sendo eliminado do SN através do plexo coróide, por intermédio de um processo que envolve um sistema carreador. O Br^- é removido do fluido cérebro espinal por transporte ativo e também pela exocitose alveolar (via vilosidades aracnoides). Como a extrusão do Br^- no SN se dá juntamente com a extrusão do fluido cérebro espinal satura o sistema carreador, pois através deste que sai normalmente o brometo.(75)

Aumentando o nível plasmático do Br^- no plasma aumenta o nível de Br^- tanto no fluido cérebro espinal quanto no fluido intersticial cerebral. Esse aumento no FCE se for de uma magnitude adequada pode saturar o sistema carreador e impedir a eliminação do brometo. Uma vez que o Br^- entra no cérebro e líquido do sangue, se não for possível a remoção deste no líquido cefalorraquidiano (CSF) pelo transporte ativo em todo o plexo coróide, a sua concentração aumenta no CSF.(75)

Quando o transporte é bloqueado, o brometo se distribui como cloreto. A grande carga de brometo satura o sistema que transporta o brometo para fora do CSF em todo o plexo coróide e inibe este processo. Certamente, o auto bloqueio deste sistema de transporte resulta em um maior nível de brometo no cérebro.(75)

A atividade farmacológica dos Br^- tem sido investigada, mas ainda permanece sem uma completa elucidação. Dois mecanismos principais foram propostos para explicar a ação antiepiléptica: hiperpolarização neuronal, através da geração de potenciais pós-sinápticos inibitórios gerados pelo influxo facilitado de íons brometo, e

acidose extracelular, gerada a partir da interação com a enzima carbono anidrase.(75, 82)

Em um estudo em células ganglionares de rã o brometo de sódio causou hiperpolarização quando se fez uma substituição equimolar de cloreto de sódio (112 mM) por NaBr no líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF) e também exibiu mínimos efeitos excitatórios sinápticos. Neste estudo o brometo aumentou rapidamente a taxa dos potenciais de ação evocados há evidências que sugerem a interação com canais de sódio, aumentando assim, a entrada de sódio na membrana ativa.(83)

Em culturas de neurônios corticais de ratos foi investigado o efeito do brometo em correntes ativadas por ácido gama-aminobutírico (GABA), empregando técnicas de clampeamento de corrente e registro intracelular. Esses achados sugerem que o brometo potencializa correntes ativadas por GABA em uma concentração terapêutica de 10 mM a 20 mM, determinando uma grande hiperpolarização induzida por GABA. Baseado nestes achados foi postulado que o efeito do brometo pode ocorrer através da potenciação de potenciais pós-sinápticos inibitórios (PIPS) obtidos pelo GABA. O receptor GABA aparece acoplado ao canal de cloro e o efeito do brometo no sítio ligado aos benzodiazepínicos tem sido relatado.(84)

Tem-se sugerido que os brometos atravessam a membrana celular mais rapidamente do que os cloretos, promovendo hiperpolarização e facilitação da ação de neurotransmissores inibitórios. De acordo com Dreifuss e colaboradores (1982), o brometo tem diâmetro de hidratação menor se comparado com o cloreto, e sendo assim apresenta movimento passivo mais rápido através da membrana celular. O movimento rápido através da membrana deveria hiperpolarizá-la, sendo ativado por neurotransmissores.

De acordo com Balcar e colaboradores (1987), o antagonismo seletivo por brometo de picrotoxina e crises induzidas por pentilenotetrazol, sugeriu que poderia agir sobre os canais de cloreto associado ao ácido γ -aminobutírico (GABA). Brometo provavelmente não aumenta a quantidade total de GABA em todo o cérebro, pode afetar a descarboxilase do ácido glutâmico ou GABA transaminase, ou alterar os receptores GABA.

1.6 JUSTIFICATIVA

Os brometos foram os primeiros fármacos eficazes para epilepsia. Introduzidos em 1853 por Sir Charles Locock, os brometos mantiveram-se úteis como opção terapêutica por aproximadamente 60 anos. Com o advento de tratamento menos tóxicos e mais eficazes, O emprego de brometos tornou-se menos usual. Porém, esses permanecem como uma ótima ferramenta no tratamento de epilepsias refratárias em crianças. Quanto ao seu mecanismo de ação foram propostos dois sistemas principais: hiperpolarização neuronal, através de potenciais pós-sinápticos inibitórios gerados pelo influxo facilitado de íons Br^- e acidose extracelular, promovida a partir da interação com a enzima anidrase carbônica.

Os estudos neurofísicos dos mecanismos moleculares subjacentes à hiperexcitabilidade e sincronização dos neurônios tem um rentável papel na busca por alvos para novas estratégias anticonvulsivantes para controlar as crises que afetam principalmente as crianças. O tratamento de crises refratárias, normalmente associadas à acumulação de cloreto intracelular, envolve uma complexa interação dos mecanismos responsáveis pelo controle do nível de cloreto intracelular. Múltiplas combinações de drogas, cada uma com mecanismos diferentes, vira a ser uma poderosa estratégia a ser investigada. Uma ação conjunta mais eficiente e com menores efeitos colaterais, pode ser obtida com cada composto sendo usado em doses menores, presumindo seus efeitos sinérgicos sobre o sistema.

Nós propusemos uma combinação terapêutica com o uso de bumetanida e brometo visando a redução da incidência de crise. A administração da bumetanida reduziria a concentração de cloreto intracelular e brometo reforçaria a negatividade E_{GABA} , onde os efeitos sistêmicos da bumetanida e brometo são descritos. Embora agindo de acordo com diferentes mecanismos, ambos os efeitos reduz a excitabilidade neuronal. Uma vez que os efeitos são complementares, as doses de bumetanida e brometo para ser utilizado podem ser reduzida, e conseqüentemente, seus efeitos colaterais também.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar o efeito do brometo de sódio sobre as atividades epileptiformes, induzidas por supressão da atividade sináptica por perfusão com ACSF 0-Ca⁺⁺ e alto K⁺ em fatias de hipocampos de ratos.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito do brometo de sódio em concentrações crescentes (5, 7, 9, 11 mM) na atividade epileptiforme interictal e ictal induzida por perfusão com ACSF zero-Ca⁺⁺ e alto K⁺, em fatias de hipocampo de ratos.
2. Determinar o possível envolvimento dos canais de cloreto a partir da utilização de bloqueadores de canais de cloreto SITS (ácido 4-acetamido-4-isotiocianatoestilbeno-2,2-disulfônico ácido) e DIDS (ácido 4,4-diisotiocinatoestilbeno-2,2-disulfônico ácido), nos experimentos com indução das atividades epileptiformes pela solução sem cálcio;
3. Verificar a influência dos cotransportadores NKCC e KCC durante o bloqueio das AE's, através dos experimentos com alta concentração de NaCl e NaBr;
4. Analisar o efeito da permeabilidade do Br⁻ sobre os canais de Cl⁻ dependente de voltagem;
5. Avaliar o efeito de competição entre os íons Cl⁻ e Br⁻;
6. Avaliar a distribuição espaço- temporal da ação do brometo de sódio sobre a AE's, utilizando o registro do sinal óptico intrínseco;
7. Analisar o surgimento da alta freqüência durante a aplicação do fármaco e o possível envolvimento das *gaps junctions*.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Para a realização deste estudo, foram utilizados 64 ratos da linhagem *Wistar*, machos, faixa etária 4 a 5 semanas, provenientes do biotério da Universidade Federal de São João Del Rei (MG). Os animais permaneceram em ambiente climatizado, recebendo ração padronizada e água *ad libitum*, com ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os procedimentos deste estudo estiveram de acordo com o protocolo 1081/05 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS e pela Comissão de Ética em pesquisa envolvendo animais da UFSJ-CEPEA (Nº19/2011).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Grupo Controle

Os experimentos (n=6) foram realizados em fatias de hipocampo de ratos *Wistar* (4 a 5 semanas). Foi utilizado o modelo de indução das atividades epileptiformes (AE's) por perfusão com ACSF zero- Ca^{++} + alto K^+ (8 mM) e registrou-se estes eventos epileptiformes. Estas fatias foram perfundidas somente com ACSF zero- Ca^{++} + alto K^+ .

3.2.2 Grupo NaBr

Os experimentos (n=24) foram realizados em fatias de hipocampo de ratos *Wistar* (4 a 5 semanas). Após indução das atividades epileptiformes (AE's) por perfusão com ACSF zero- Ca^{++} + alto K^+ (8 mM), o Br^- foi perfundido num tempo de 20 min. Foi feita uma substituição equimolar nas seguintes concentrações: 5, 7, 9 e 11 mM de NaCl por 5, 7, 9 e 11 mM de NaBr, numa solução sem Ca^{++} e com alto K^+ (8 mM).

3.2.3 Grupo NaCl

Para os registros (n=7) com alta concentração de NaCl, esse foi dissolvido em ACSF zero-Ca⁺⁺ (aumento de 15 mM na concentração de NaCl) em uma concentração final de 142 mM e aplicado por perfusão (tempo: 20min).

3.2.4 Grupo SITS

Para os registros (n=3) com o bloqueador de canais de cloreto (SITS, ácido 4-acetamido-4-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfônico ácido), esse foi dissolvido em ACSF zero-Ca⁺⁺ + alto K⁺ em uma concentração final de 1 mM e aplicado por perfusão (tempo: 20min a 30min).

3.2.5 Grupo DIDS

Para os registros (n=8) com o bloqueador de canais de cloreto DIDS (ácido 4,4-diisotiocinatoestilbeno-2,2-disulfônico), esse foi dissolvido em ACSF zero-Ca⁺⁺ + alto K⁺ em uma concentração final de 250 µM e foi aplicado por perfusão (tempo: 20min).

3.2.6 Grupo OCTANOL + NaBr

Para os registros (n=12) com o bloqueador de *gaps junctions* (N-OCTANOL), esse foi dissolvido em ACSF zero-Ca⁺⁺ + alto K⁺ numa concentração final de 0,07 mM e foi aplicado por perfusão (tempo: 20min).

3.3 CURVA DE ALTA CONCENTRAÇÃO DE NaCl

Para saber a chegada do brometo e o tempo de exposição a esse fármaco durante as AE's, foi estimado o comportamento da concentração do NaBr e assim o tempo de exposição a esse fármaco. Para isso foi feita uma curva de NaCl, todo final dos experimentos, sendo que no lugar da substância em estudo, utilizou-se alta concentração NaCl e foi registrado o potencial elétrico extracelular. Pela curva foi possível verificar que o brometo de sódio leva certo tempo para chegar às fatias como indicado pela linha vermelha e permanece atuando por um tempo como

indicado pela linha azul (Figura 8). Assim é possível verificar as descargas em salva (*bursts*) que estão sobre a influência do brometo.

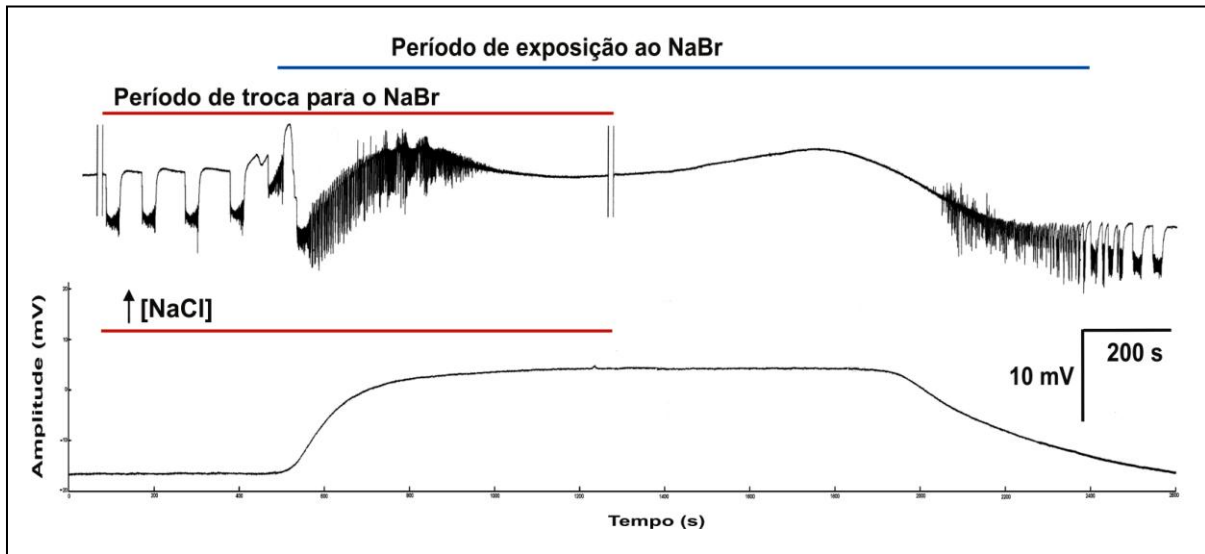


Figura 8 Exemplo típico de um experimento com aplicação de brometo. A linha vermelha indica o tempo para o NaBr chegar à fatia e a linha em azul o seu tempo de atuação.

3.4 PREPARO E MANUTENÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAIS

Os animais foram decapitados para o isolamento dos hipocampos. Imediatamente a calota craniana foi exposta fazendo-se um corte longitudinal no escalpo (figura 9A), depois foi cortada mediana e lateralmente (figura 9B). Posteriormente as partes superiores da calota craniana foram removidas (figura 9C) permitindo a retirada do encéfalo (figura 9D). Já completamente desconectado, o encéfalo foi retirado e imerso em ACSF (líquido cefalorraquidiano artificial) normal (composição: 127 NaCl, 2 KCl, 1.5 MgSO₄, 1.1 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 10 glicose), resfriada 0 a 2 °C (Figura 9 E)

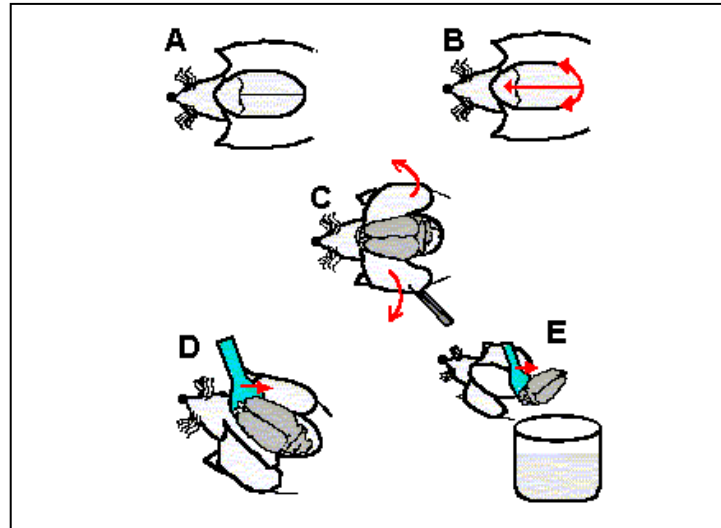


Figura 9 Esquema do procedimento realizado para a retirada do encéfalo da cavidade craniana. A) abertura do escalpo; B) corte mediano e lateral na calota craniana; C) remoção das partes superiores da calota craniana; D) retirada do encéfalo da cavidade craniana; E) remoção do mesmo para uma solução nutritiva.

Em um segundo momento, para separação dos hipocampos, o encéfalo foi removido para uma placa de petri forrada com papel filtro e banhado constantemente com a mesma solução ACSF normal. Com auxílio de um bisturi foram feitas duas incisões para separar, primeiro, o cerebelo e, depois, os dois hemisférios cerebrais. Enquanto um dos hemisférios era dissecado, o outro era mantido imerso em solução ACSF normal resfriada (0 a 2° C). O procedimento de dissecação de cada hemisfério foi iniciado com um corte para retirada do córtex frontal. A face desse corte foi utilizada para apoiar o restante do hemisfério cerebral sobre o papel filtro. Duas micro-espátulas especiais auxiliaram para retirada do tálamo. Após remoção do tálamo, torna-se mais fácil a visualização do dorso inferior do hipocampo. Introduziu-se cuidadosamente as espátulas por baixo de seu dorso, o hipocampo foi virado e completamente isolado.

Após o isolamento dos hipocampos, os mesmos foram fatiados em um fatiador do tipo “Mc Ilwain” (figura 10), obtendo-se fatias de 400 μm de espessura. Cálculos de difusão de oxigênio sobre o tecido mostram que as fatias devem ter essa espessura.(85) As fatias foram imediatamente transferidas para a câmara de perfusão para descanso, a qual era sempre preenchida com solução de ACSF normal e mantida à temperatura e oxigenação constantes. Após cerca de 40 minutos de perfusão as fatias foram transferidas para a câmara de interface, para registro das atividades epileptiformes. As fatias foram colocadas sobre uma membrana (0.4 μM Millicell culture plate inserts; Millicell, Bedford, MA, USA) e inicialmente

perfundidas em ACSF normal (em mM: 127 NaCl, 2 KCl, 1.5 MgSO₄, 1.1 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 10 glicose; pH equilibrado em 7,4 com oxigenação). Posteriormente a solução foi trocada por uma segunda solução alterada (em mM: 127 NaCl, 7 KCl, 1.5 MgSO₄, 1.1 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 0 CaCl₂, 10 glicose). O alto K⁺ necessário para gerar a excitabilidade do tecido e o zero Ca⁺⁺ para bloquear as conexões sinápticas.

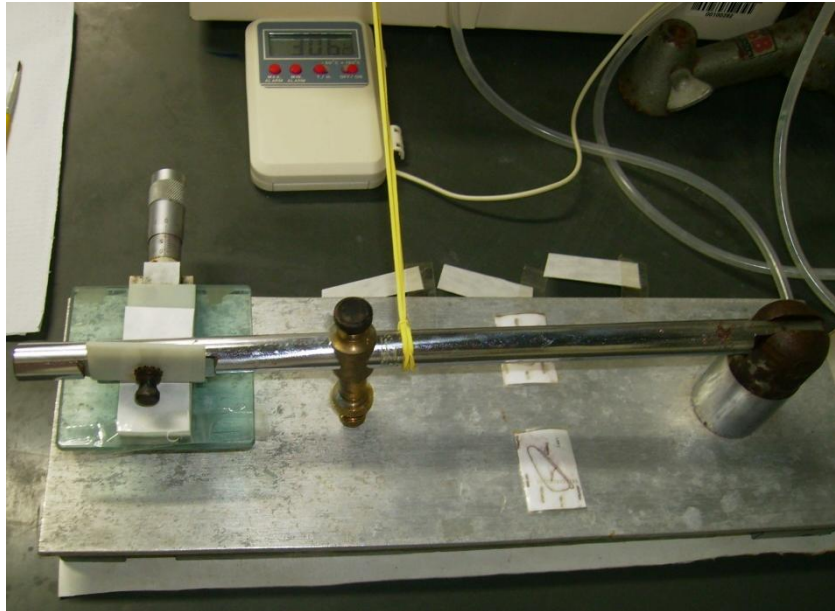


Figura 10 Fatiador do tipo “McIlwain tissue slicer” (vista superior). Os hipocampus foram posicionados na mesa móvel formando ângulo de 70° em relação a fímbria do hipocampo.

3.5 SOLUÇÕES DE PERFUSÃO

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

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

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

* Substituição equimolar dos íons Cl⁻ por Br⁻

O Br⁻ foi aplicado por substituição equimolar nas seguintes concentrações: 5, 7, 9 e 11 mM de NaCl por 5, 7, 9 e 11 mM de NaBr.

Para evitar floculação, o pH foi ajustado para 7,4, através de borbulhamento com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), antes da adição dos sais contendo íons divalentes.

3.6 REGISTRO ELETROFISIOLOGICO - EQUIPAMENTOS

3.6.1 Câmara de perfusão

A câmara de perfusão tem como função manter em descanso as fatias, preservando-as de lesões de excitotoxicidade, comuns após o procedimento de corte. A câmara foi fabricada no Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional da Universidade Federal de São João Del Rei (LANEC-UFSJ) e é constituída de conexões e tubos em PVC, que são estruturados em forma de U (figura 11). As fatias eram colocadas em uma rede de nylon, que fica situada no ramo com maior diâmetro. Todo o sistema foi preenchido com ACSF normal (em mM: 127 NaCl, 2 KCl, 1.5 MgSO₄, 1.1 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 10 glicose, pH equilibrado em 7.4, através de constante oxigenação (95% O₂ e 5% CO₂). Através do borbulhamento com mistura carbogênica, também foi estabelecido um fluxo de solução que permite uma perfusão suave e adequada das fatias, sempre as mantendo em descanso sobre a rede de nylon. Através do banho-maria, a câmara de perfusão permanece com temperatura controlada de aproximadamente 31,5° C. As fatias foram armazenadas nesta câmara por pelo menos 40 minutos.

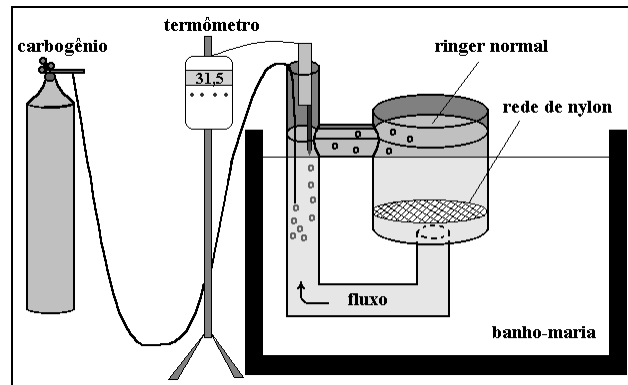


Figura 11 Diagrama esquemático da câmara de perfusão montada com tubos e conexões em PVC. A câmara é preenchida com ACSF normal, mantida a temperatura e oxigenação constantes. As fatias são depositadas no ramo de maior diâmetro sobre uma rede de nylon.

3.6.2 Câmara de interface

Após o tempo determinado de descanso na câmara de perfusão, as fatias foram transferidas para outra câmara, chamada câmara de interface. Essa câmara de interface foi construída, também no LANECS-UFSJ, especialmente para este trabalho, em material acrílico transparente e tubos de PVC, como mostrado na figura 12. Consiste de dois compartimentos: a cuba, que é a parte superior da câmara (mostrada à esquerda por uma visão superior), e o banho-maria, que consiste da parte inferior (apresentada com detalhes à direita através da vista lateral).

A cuba é composta por três cilindros, sendo dois de PVC e um, o exterior, de acrílico transparente. Possui também uma base em acrílico transparente, a qual é acoplada à parte superior do banho-maria. O cilindro central delimita com o intermediário um compartimento que é preenchido com a solução de banho, que pode ser ACSF normal ou outra solução alterada, dependendo do experimento. As fatias foram depositadas sobre o cilindro central (figura 12.1). Neste cilindro é colocada uma membrana (0.4 μm Millicell culture plate inserts; Millipore, Bedford, MA, USA) que fica transparente quando perfundida na solução.

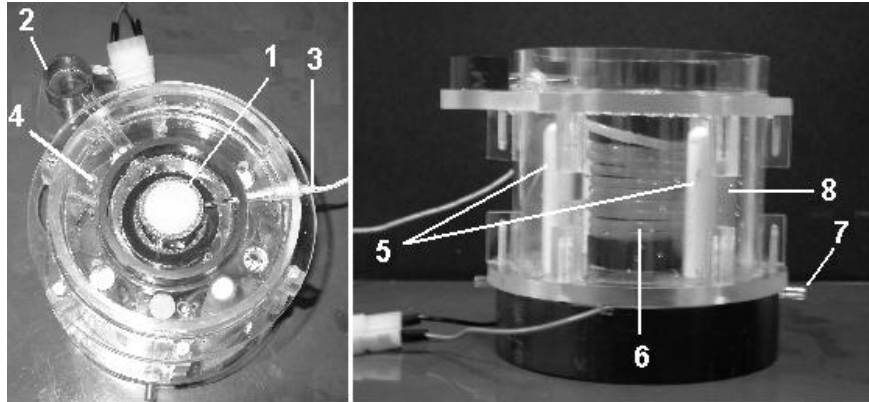


Figura 12 Câmara de interface. Sendo, à esquerda, vista superior mostrando em detalhe a constituição da cuba. Em 1, membrana millipore, o local onde as fatias foram depositadas; em 2, o recipiente por onde é controlado o nível da solução de banho das fatias; em 3, o termômetro responsável pelo controle da temperatura da solução de banho das fatias; e, em 4, os orifícios por onde chega o oxigênio na câmara. Em 5, são mostradas duas das quatro resistências envolvidas em invólucros de vidro; em 6, o tubo enrolado no cilindro central por onde passa a solução de banho aquecida; em 7, o local por onde o carbogênio chega na câmara; e em 8, um dos dois borbulhadores de oxigênio existentes na câmara.

Ainda na câmara de interface, o nível da solução é controlado através de sucção, utilizando uma bomba à vácuo de diafragma. Através do recipiente isolado e vaso comunicante (figura 12.2), é controlada a altura da solução de banho que mantém as fatias na interface solução de ACSF Normal / oxigênio umidificado. O oxigênio chega à cuba através de perfurações que se encontram entre o cilindro de acrílico mais externo e o cilindro de PVC intermediário (figura 12.3).

O banho-maria é composto de 4 resistências (5Ω , 20 W) ligadas em paralelo e encerradas em invólucros de vidro. Duas delas são vistas na figura 12, indicadas pelo número 5. As resistências são alimentadas com tensões contínuas até 12V, permitindo o aquecimento da água destilada dentro da câmara. As tensões são controladas via um software em plataforma LABVIEW 6.1 (NATIONAL INSTRUMENTS). A intensidade da tensão é calculada de acordo com a temperatura desejada através de um módulo de controle eletrônico. Esse módulo é comandado por meio de uma placa AD/DA (modelo PCI-6071E – NATIONAL INSTRUMENTS) em conjunto com o software. O equipamento é capaz de manter temperaturas constantes em torno de 34°C , com precisão de um décimo de grau. A água contida no banho-maria aquece as paredes do tubo, enrolado ao cilindro central no interior do recipiente (figura 12.6), que conduz a solução para a cuba, permitindo a perfusão das fatias com a temperatura da solução devidamente controlada. Tubos de plástico conduzem o carbogênio ao interior do banho-maria (figura 12.7) para ser distribuído,

por meio de borbulhadores (figura 12.8), dentro da água. Assim, o carbogênio é aquecido e umidificado para, a seguir, ser direcionado sobre a face superior das fatias mantidas na cuba.

Uma tampa em forma de disco encobre o ambiente em torno das fatias, permitindo uma melhor oxigenação e contribuindo para homogeneizar a temperatura no interior da cuba. A tampa contém um orifício central que permite a inserção do eletrodo para o registro do potencial elétrico, bem como a exaustão do carbogênio.

Na câmara de interface, as fatias foram posicionadas sobre a membrana, situada na interface – líquido de perfusão / carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂) umidificado. No primeiro momento, a perfusão foi feita com ACSF normal. A seguir, a perfusão foi trocada para a solução de indução (ACSF 0- Ca⁺⁺ e alto K⁺).

3.6.3 Registro do Potencial Elétrico Extracelular (PE)

Para aquisição dos sinais do potencial elétrico extracelular (PE), foi utilizado um eletrodo formado por filamentos de prata e micropipeta de vidro (modelo THINWALL, TW150F-3 – WPI). A pipeta foi estirada em um puxador de pipetas (modelo DMZ UNIVERSAL PULLER – ZEITZ-INSTRUMENTS) e preenchida com solução de NaCl 1,0 M, com resistência final de 5 a 10 MΩ, suficiente para proporcionar um baixo nível de ruído. Os filamentos de prata foram cloretados (numa fonte de corrente contínua) para se evitar o efeito de bateria provocado pela acumulação de cargas na interface metal-líquido. Após cloretado, o eletrodo foi conectado a uma headstage (modelo AI 402 x 50, ULTRALOW NOISE AMPLIFIER – AXON INSTRUMENTS) interligada a um amplificador (modelo CYBERAMP 380 – AXON INSTRUMENTS) para a aquisição do sinal. O programa SAE (Sistema Auxiliar de Experimentos), desenvolvido no LANECS, foi utilizado para controle do amplificador, digitalização, exibição em tempo real e armazenamento em arquivos. A amostragem do sinal foi feita na taxa de 10.000 amostras por segundo, o sinal foi amplificado 500 vezes e foi utilizado um filtro para redução do ruído de fundo. O processamento do sinal foi feito off-line. O programa MATLAB 6.5 (MATHWORKS) foi utilizado como saída gráfica. O computador empregado na aquisição e processamento dos sinais foi um Pentium III de 1 GHz e 512 MB de RAM.

Um microscópio estereoscópico (modelo NIKON – SMZ 1500), com capacidade de ampliação de 112.5 vezes, foi utilizado para visualizar as fatias pelo

método de luz transmitida. No intuito de manter a câmara de interface fixa, a montagem do microscópio foi feita sobre uma mesa XY, independente da câmara, permitindo ajustar o campo visual, sem mover a câmara. Dessa forma, o microscópio varre toda a extensão da membrana onde se encontram as fatias, permitindo uma melhor visualização de suas camadas, sem o inconveniente de deslocar o eletrodo, quando da mudança do campo visual.

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

Para minimizar as vibrações mecânicas durante os experimentos, utilizou-se uma mesa anti-vibração, que consiste em um tampo de pedra suspenso por câmaras de ar, onde são dispostos os equipamentos. As câmaras de ar permitiram ajustar o nível de trabalho da mesa. No intuito de isolar os equipamentos de possíveis interferências eletromagnéticas, a mesa foi envolvida por uma gaiola de Faraday. (Figura 13).



Figura 13 Equipamentos utilizados para obtenção do registro simultâneo do PE e do IOS durante as AE's em fatias do hipocampo. 1- Amplificador CYBERAMP 380 para amplificação do sinal elétrico; 2- "Setup" para registro do potencial elétrico extracelular; 3- Pré-amplificador (Headstage modelo AI 402 x 50) para aquisição dos sinais e foi interligada a um amplificador biológico; 4- Microscópio

estereoscópico (modelo NIKON – SMZ 1500) para visualização das fatias e obtenção do IOS; 5- Imagem do sinal óptico intrínseco obtida na tela do microcomputador através do programa Matlab 6.5 (Imagem VET_online).

O PE foi registrado a partir do posicionamento do eletrodo de registro no giro dentado (GD). O eletrodo foi conectado a uma headstage por meio de um holder. A headstage foi interligada a um amplificador biológico. Os sinais foram armazenados em um computador. Para o registro do IOS, as fatias foram iluminadas pela luz gerada na base do microscópio. Uma binocular acoplada à câmara de CCD foi utilizada para captura da luz transmitida.

3.7 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PARÂMETROS DO POTENCIAL ELÉTRICO EXTRACELULAR (PE)

Para análise quantitativa do PE, foram observados parâmetros como: amplitude da componente DC (variação negativa da linha de base do sinal elétrico extracelular), amplitude dos PS's, e duração dos eventos (DE). Com a ajuda do MATLAB, versão 7.1, foram desenvolvidos, no LANECS, programas para leitura e análise dos arquivos contendo os potenciais elétricos registrados durante os experimentos, conforme procedimentos descritos a seguir

3.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DA AMPLITUDE DA COMPONENTE DC

A Transformada Discreta de Fourier (DFT) foi utilizada como ferramenta e aplicada ao sinal do potencial extracelular, para separar a componente DC dos PS's, cujas componentes juntas formam os *bursts* epileptiformes. Assim, a partir do cálculo da DFT do sinal elétrico (exemplo ilustrado pela figura 14), foi possível cortar a frequência baixa, abaixo de 10 Hz, que corresponde à componente DC da frequência alta que corresponde aos PS's. Posteriormente, fazendo a Transformada Inversa de Fourier, foi obtido o sinal contendo apenas a componente DC, sem os PS's.

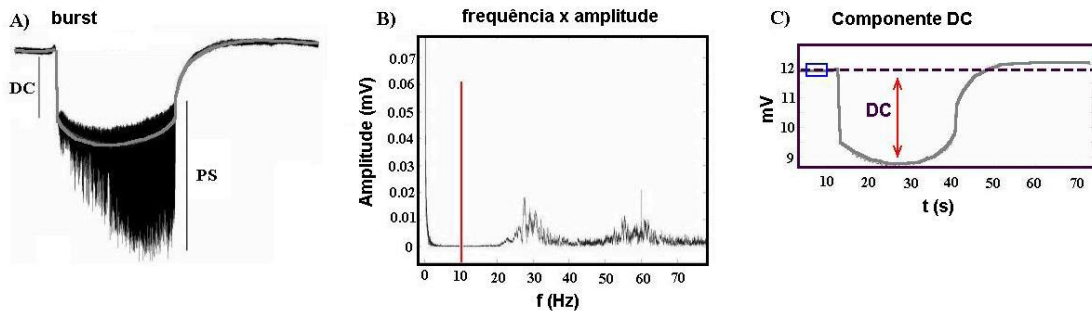


Figura 14 Procedimento para obtenção da componente DC. A) O sinal completo de um *burst* contendo a componente DC e os PS's. B) O sinal elétrico após a aplicação da Transformada de Fourier, indicando o espectro de frequência x amplitude. A frequência foi cortada abaixo de 10 Hz. C) O sinal elétrico da componente DC livre dos PS's. A componente DC é a variação máxima do sinal em relação a linha de base (linha pontilhada).

Uma vez obtida a componente DC, a linha de base foi determinada pela média de um trecho do PE antes do evento. Assim, a amplitude da componente DC foi obtida como sendo a variação máxima do sinal em relação à linha de base.

3.9 ANÁLISE QUANTITATIVA DA AMPLITUDE DOS *POPULATIONS SPIKES*

Para o cálculo da amplitude dos PS's, foi feita a subtração do sinal completo, que corresponde ao *burst* (DC + PS's), pelo sinal sem os PS's (sinal da componente DC). Restando apenas o sinal correspondente a alta frequência, calculou-se seu módulo e depois a integral, obtendo-se assim, os valores de contribuição dos PS's nos *bursts*. Na figura 15 tem-se a ilustração desses procedimentos.

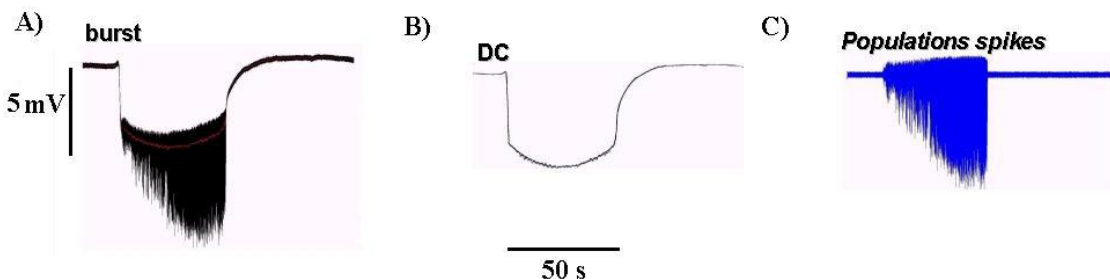


Figura 15 Representação do procedimento adotado para obtenção da amplitude dos PS's. Em A) observa-se o sinal completo, em B) observa-se o sinal da componente DC, que será subtraído do sinal completo e, em C), observa-se o resultado da subtração, que é o sinal referente aos PS's.

3.10 ANÁLISE QUANTITATIVA DA DURAÇÃO DOS EVENTOS

A partir da linha de base e do sinal da componente DC, a duração dos eventos foi calculada. Para isso, foram adotados os instantes t_{final} e t_{inicial} , que estão

representados na figura 16. O instante de tempo inicial foi considerado quando o sinal atinge uma variação de 20 % da amplitude máxima, em relação à linha de base, e, o instante de tempo final, quando o sinal retorna à 20 % da amplitude máxima em relação a linha de base. Subtraindo-se t_{final} de t_{inicial} , foi obtida a duração do evento.

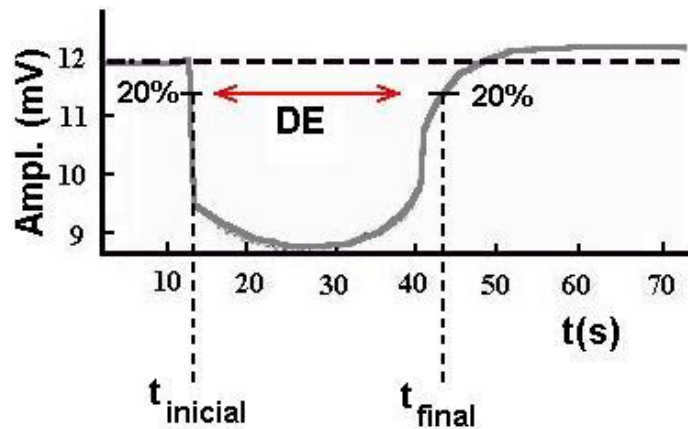


Figura 16 Exemplo da técnica utilizada para o cálculo da duração do evento. Subtraindo-se o instante t_{final} pelo instante t_{inicial} (maiores detalhes no texto), encontra-se a duração do evento da AE.

3.11 SINAL ÓPTICO INTRÍNSECO

Esta técnica possibilita o monitoramento do surgimento das atividades epileptiformes espontâneas nas fatias de hipocampo, auxilia no posicionamento dos eletrodos e também possibilita avaliar a extensão do recrutamento.

A técnica consiste em uma transiluminação das fatias usando uma lâmpada (PHILIPS – *Projection Lamp*, 6 V e 20 ou 30 W) do sistema de iluminação do microscópio binocular na posição vertical (modelo SMZ 1500- Nikon, Japão).(86, 87) As fatias foram vistas de cima através de uma objetiva de 3× ou 4×, dependendo do tamanho da região de estudo. As imagens de vídeo foram capturadas com uma câmera CCD –CoolSNAP Procf 1,4 megapixel, EUA). As imagens foram processadas on-line para compor as características espaço-temporal (CET). Para este efeito, os quadros foram digitalizados por meio de uma placa de aquisição de quadros (DC10 Plus, Pinnacle, EUA), controlado por um software desenvolvido em plataforma de aquisição MatLab. Todas as imagens foram capturadas a uma taxa de 30 quadros por segundo. Opcionalmente, as imagens podem ser processadas off-line. Neste caso, todos os quadros capturados foram armazenados em um disco DVD. O sinal eletrográfico foi usado para controlar o intervalo de quadros para ser

capturado. Para obter as imagens das mudanças de transmissão de luz (VTL), o cálculo foi realizado de forma semelhante ao método descrito por Holtkamp e colaboradores. (2003) e Andrew e colaboradores (1996). Uma vez determinada a sequência de quadros correspondentes às AE's, foi extraído o IOS de um sítio de interesse da fatia. O IOS é extraído a partir do cálculo das intensidades de luz de cada *pixel* do sítio, referente a um determinado quadro, a partir das médias das três componentes correspondentes ao padrão RGB do *pixel*. Calculadas as intensidades de cada *pixel* do sítio, para cada quadro da sequência, obtém-se um sinal do tipo $I^{i,j}(t)$, que corresponde à intensidade de luz do *pixel* de coordenadas (i,j), para cada instante de tempo, t, da sequência de quadros. A intensidade média de luz do sítio de interesse é dada por (equação 1):

$$\bar{I}(t) = \frac{1}{m \times n} \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m I^{i,j}(t),$$

Considerando que cada sítio selecionado corresponde a um retângulo com m x n *pixels*.

A variação da intensidade média dos *pixels* desse sítio, durante as AE's, pode ser calculada tendo como referência a intensidade de luz, medida no mesmo sítio, chamada de intensidade controle, I_{cont} , que é uma média das intensidades dos sítios dos quadros que antecedem o evento. Assim, a variação da intensidade média dos *pixels* do sítio, $\Delta\bar{I}(t)$, foi obtida da diferença (equação 2):

$$\Delta\bar{I}(t) = I_{cont} - \bar{I}(t),$$

que normalizada pela própria intensidade controle, fica (equação 3):

$$\Delta\bar{I}_N(t) = \frac{\Delta\bar{I}(t)}{I_{cont}}$$

O resultado, portanto, foi uma sequência de imagens que correspondem ao IOS do giro dentado, ao longo do tempo. Essas imagens, apresentadas de forma

sequencial, como um filme, permitiram acompanhar a evolução temporal dos eventos de AE's na camada granular do giro dentado das fatias de hipocampus. Usando uma escala de intensidade de cinza, a série de imagens da variação de transmitância de luz (VTL) revelou áreas da fatia onde variaram as mudanças de transmitância de luz com o tempo. Condensou-se em uma única imagem as características espaço-temporal (CET) da atividade paroxística, o contorno da camada envolvida na atividade assemelha-se a uma poligonal, elaborado manualmente, definindo as posições de pixels que são ligados formando a figura (poligonal 17.A). As imagens CET foram construídas coluna por coluna. Para cada imagem VTL, a intensidade média dos pixels de uma região quadrada (21×21 pixels) centrada em cada pixel da poligonal foi calculada. Estes valores são as intensidades de cada pixel da coluna obtida retificando as poligonais através de uma linha vertical. A imagem CET é composta por essas colunas, da esquerda para a direita, seguindo a seqüência temporal (Figura 17.B e 17.C).(88)

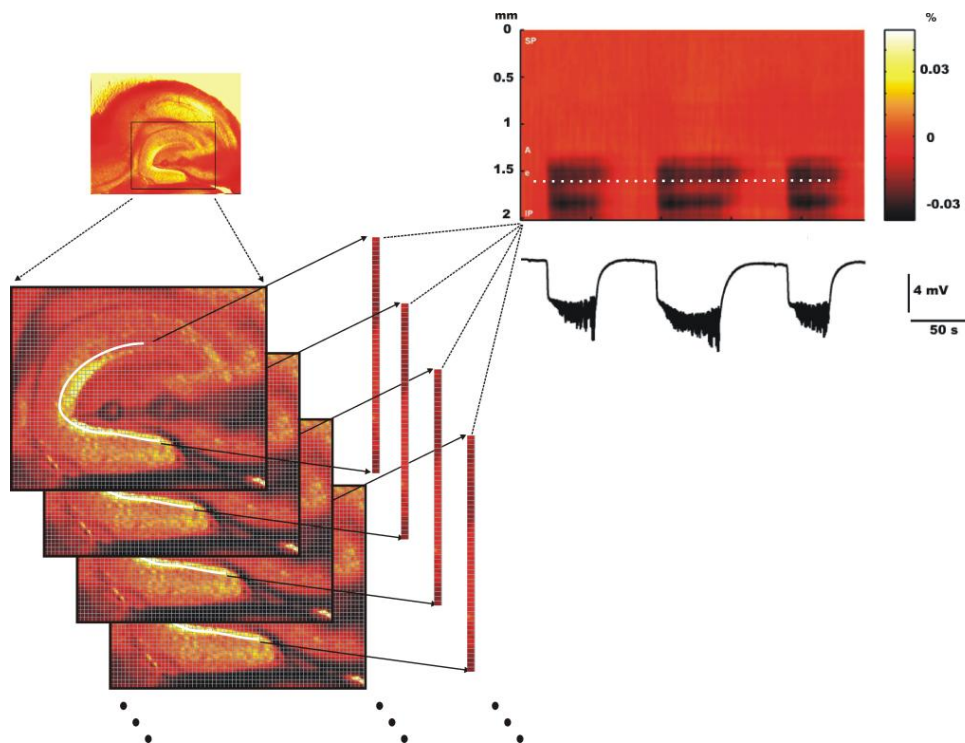


Figura 17 Representação esquemática do procedimento para compor as imagens CET. (A) fatia de cérebro e as poligonais que representam o contorno da camada de interesse. (B) seqüência temporal de quadros mostrando as poligonais retificadas, extraído de cada uma delas. (C) Disposição de cada poligonal retificada lado a lado, as imagens são compostas CET e os pixels são calculados de acordo com a equação 1. A escala indica o percentual da variação de transmitância de luz de acordo com a equação 3. Retirado de Almeida e colaboradores (2011).

4 RESULTADOS

4.1 POTENCIAL ELÉTRICO EXTRACELULAR

As atividades epileptiformes (AE's) foram induzidas na camada granular do giro dentado com ACSF zero- Ca^{++} e com alto K^+ . Mudanças na $[\text{K}^+]_o$, levaram ao aparecimento de atividades tipo *bursts* (descargas em salva). Os eventos epileptiformes foram caracterizados pelo decaimento lento da linha de base superposto pelas populações de espículas com grande amplitude.

Para obtenção dos potenciais de campo todas as fatias hipocâmpais foram expostas ao ACSF zero Ca^{++} e com alto K^+ . O surgimento das AE's espontâneas iniciou-se aproximadamente após 40 min de perfusão (tempo de latência para os animais na faixa etária de 4 a 5 semanas). Posteriormente cada grupo recebeu um tipo de tratamento.

4.1.1 Grupo NaBr

O Brometo de sódio foi utilizado em 4 concentrações (5, 7, 9 e 11 mM). Foram realizados $n=24$ registros com NaBr, obteve-se 6 registros para cada concentração. As fatias foram expostas ao brometo de sódio por 20 minutos para avaliar sua atividade antiepiléptica, *in vitro*. Através do sistema de perfusão, a troca completa das soluções levou aproximadamente 2,5 min. A figura 18.1 mostra um exemplo típico de cada concentração dos potenciais de campo. Os eventos analisados são característicos do giro dentado, com amplitude de 10 mV, duração dos eventos entre 30 a 60 s, intervalo entre eventos com variação de 50 s e componente DC 5 a 10mV.

Todos os registros de campo com NaBr nas 4 concentrações foram caracterizados por um aumento da frequência dos eventos antes do bloqueio das AE's (figura 18.2) e uma diminuição destes com posterior desaparecimento das amplitudes.

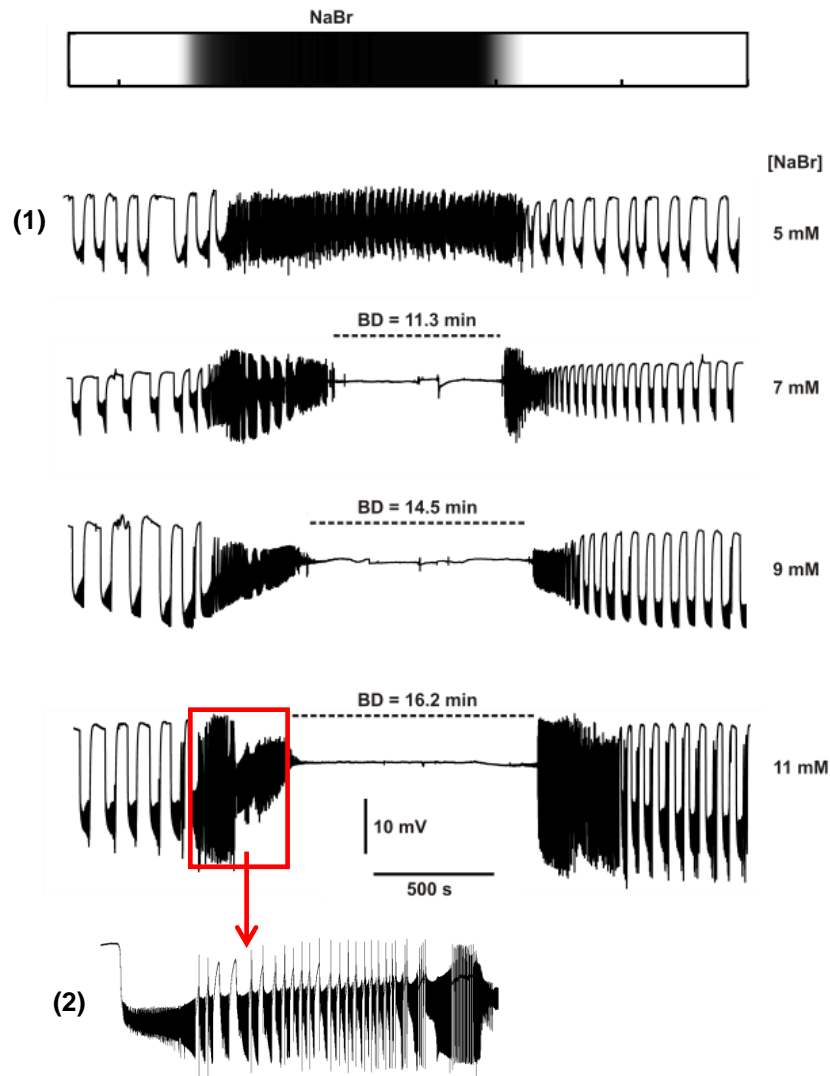


Figura 18 Casos típicos dos registros de potenciais de campo nas quatro concentrações de NaBr. Em 1- utilizou-se uma concentração de 5 mM de NaBr seguido por 7 mM, 9 mM e 11 mM. Em 2 ampliação do trecho da alta frequência dos eventos presente em todos os registros.

Com auxílio de um capacitor hidráulico foram também realizados registros com NaBr 9 mM ($n=4$), para diminuir a taxa de excursão do íon Br^- nas fatias e com isto tentar extinguir a alta frequência dos eventos. Verificou-se uma prolongação da alta frequência e podemos inferir que este efeito do NaBr é dependente da concentração e não do tempo de exposição das fatias ao fármaco (figura19).

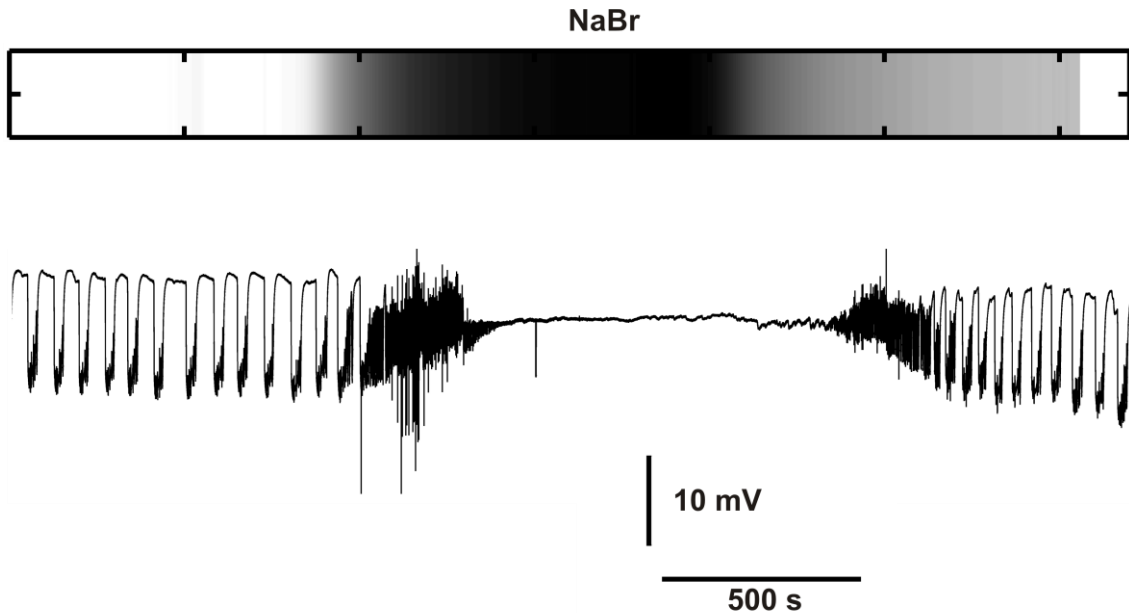


Figura 19 Exemplo de um registro de campo com aplicação de NaBr 9 mM de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao NaBr 5 mM (tempo: 20 min). A barra acima mostra o tempo de exposição ao fármaco de acordo com as escalas de cinza.

A supressão ou não das AE's foi demonstrada através da aplicação do NaBr nas quatro concentrações. Com estes dados foi construído gráfico do tempo de bloqueio (min) x concentração (mM) (figura 20) com seus respectivos valores das médias e desvio padrão. Em 7 mM teve supressão das atividades em 4 registros (n=6), 9 mM (n=6) e 11 mM (n=6) houve o bloqueio em todas as fatias (figura 18.1). Na reperfusão com ACSF 0-Ca⁺⁺, presenciemos reversibilidade das AE's em todas as fatias, sem dano nas atividades neuronais. A resposta do NaBr foi concentração-dependente (figura 20). Com ajuste de uma função sigmoidal, foi construída a curva dose-resposta. Esta indicou que para o bloqueio total das AE's foram necessários, aproximadamente, 9 mM de NaBr. (C_{E50} - concentração que produz 50 % do efeito máximo).

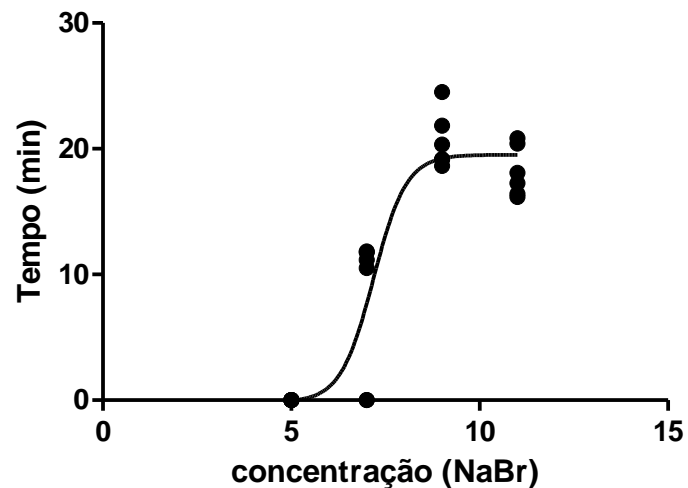


Figura 20 Gráfico da relação concentração-resposta (redução ou supressão das AE's pelo NaBr 5, 7, 9 e 11 mM). Cada ponto representando a média dos registros extracelulares do potencial elétrico de cada concentração e a média dos tempos destes registros. Este gráfico mostra que na concentração de 7 mM se tem um bloqueio das AE em quatro registros (n=6), 9 mM é a concentração suficiente para a supressão das AE (n=6) e com 11 mM existe uma saturação da resposta (n=6).

O NaBr suprimiu as AE's e foi reversível com a reperfusão com ACSF zero- Ca^{++} e alto K^+ . Foram analisados os parâmetros amplitude da componente DC (mV), intervalo entre eventos (IE)(s), duração do evento (DE) (s) e amplitude dos populations spikes (PS) (mV) antes (6 bursts de cada registro) e após (6 bursts de cada registro) a perfusão com o fármaco (figura 21). Esses grupos de NaBr foram comparados com grupo controle (n=6). Os dados foram normalizados mediante a razão entre os valores após e antes da aplicação do NaBr e do grupo controle. Observa-se que não houve diferença significativa entre as médias normalizadas das diferentes concentrações de NaBr e o controle para componente DC; para as variáveis PS e IE houve diferença significativa entre o controle e a concentração de 11 mM; e a variável DE mostrou diferença significativa entre o controle e as concentrações de 7, 9 e 11 mM.

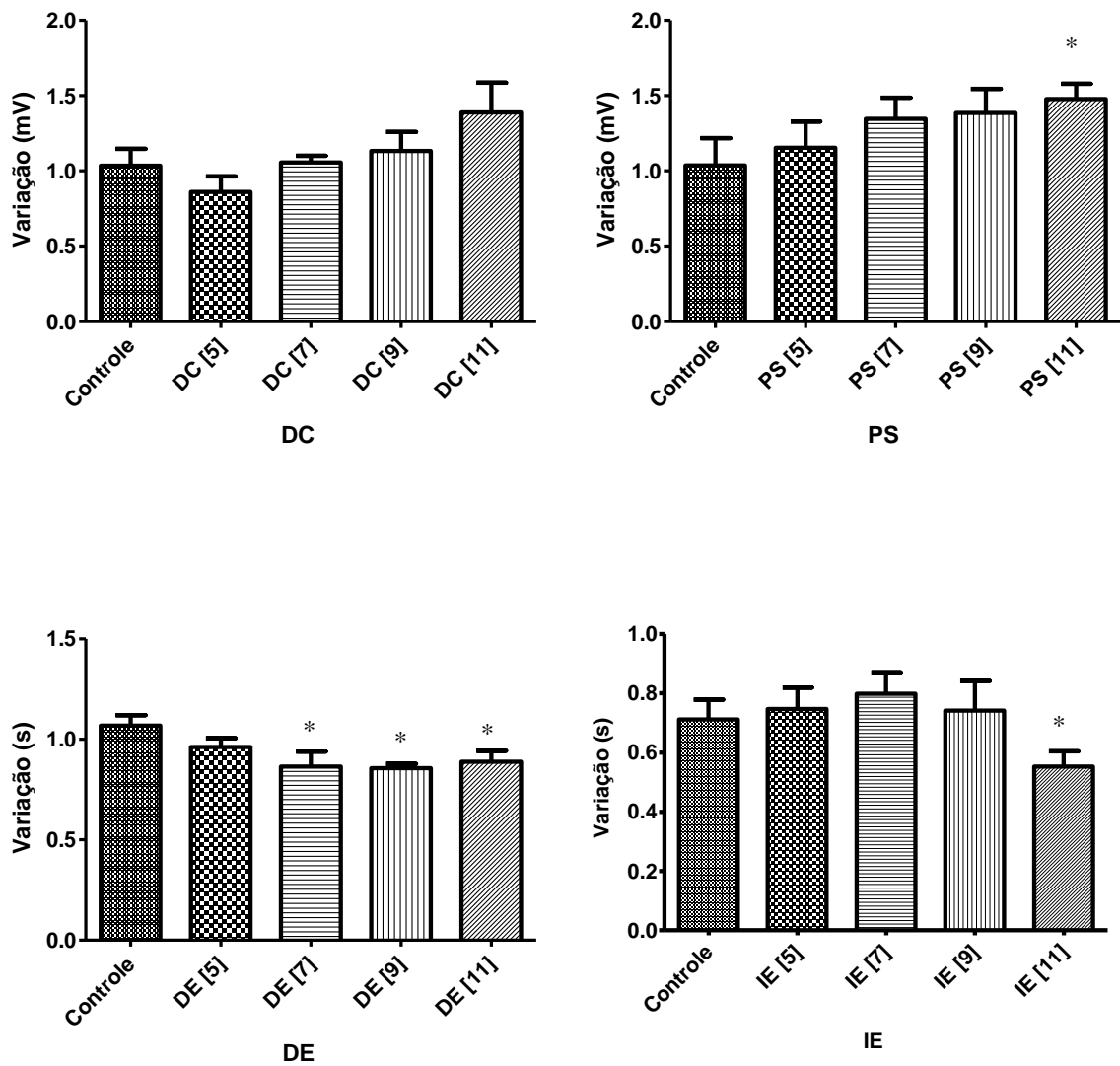


Figura 21 Efeito do NaBr no componente DC e nas variáveis de PS, IE e DE. A presença de asteriscos mostra a existência de diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade de erro, entre as médias mediante o teste de Mann-Whitney.

4.1.2 Grupo NaCl 142 mM

A solução de ACSF zero- Ca^{++} e com alto K^+ foi modificada, aumentou-se 15 mM na concentração de NaCl (142 mM). Foram realizados 7 registros de campo com alta concentração de NaCl (figura 22 A). O incremento na concentração de NaCl resultou após 10 ± 5 min no prolongamento do estado interictal para $1,51 \pm 0,12$ (normalizado em relação à média dos IE dos seis eventos que precederam o incremento de NaCl). No final da perfusão, a atividade epileptiforme não-sináptica tinha tendência a voltar para a duração do estado interictal anterior para a perfusão,

como pode ser visto pela curva ajustada aos dados (Figura 22B). Não foram observadas alterações significativas para os parâmetros componente DC, DE e PS.

Abaixo o gráfico com análise dos intervalos entre eventos antes da perfusão da alta concentração de NaCl (6 eventos anteriores) e durante a aplicação. Foram calculados os tempos de bloqueio parcial e estes foram normalizados com a média dos intervalos entre eventos antes da perfusão com NaCl 142 mM (figura 22 B).

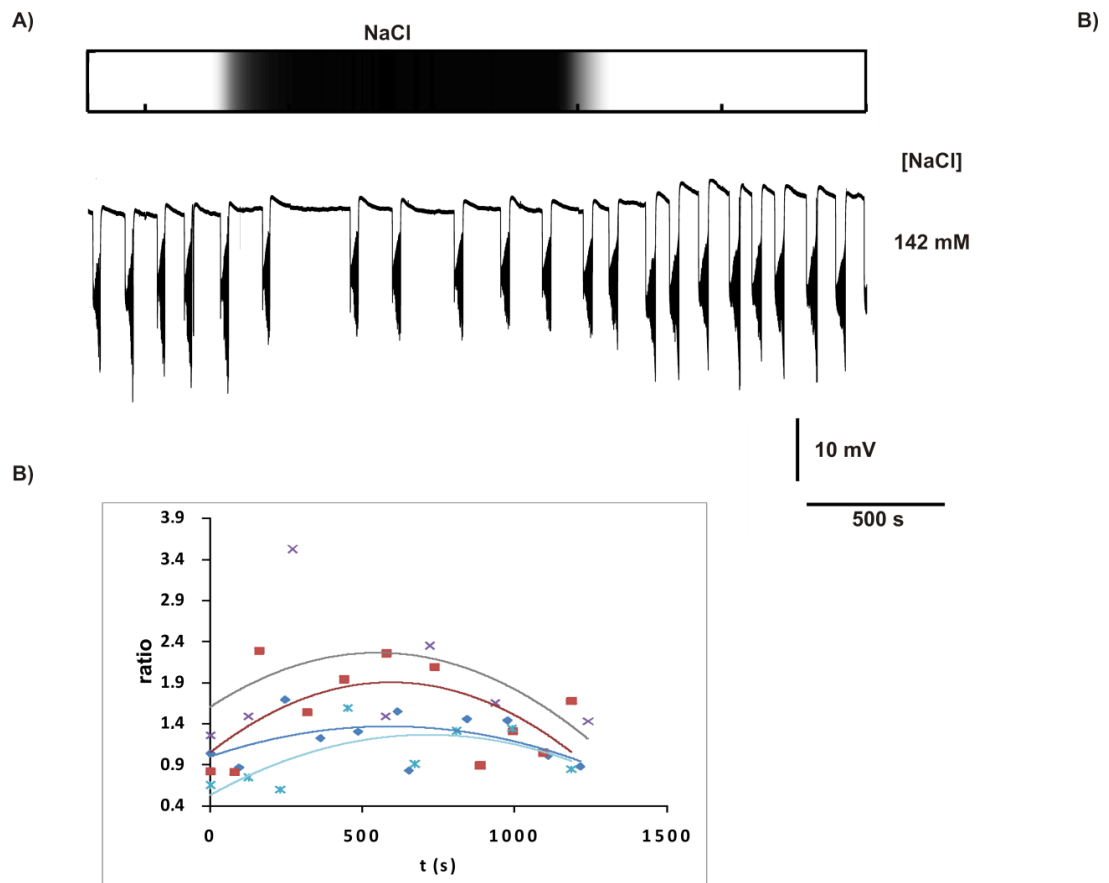


Figura 22 Em (A) exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao NaCl 142 mM (tempo: 20 min). Em (B) a média do IE (s) de 6 eventos antes da aplicação de NaCl foi utilizada como fator de normalização, ou seja, o intervalo para cada evento após a aplicação foi dividido por esse fator mostrando que o IE aumenta com cerca de 1 min e retorna após 20 min de aplicação.

Podemos observar um bloqueio transitório, seguido de um reequilíbrio das atividades epileptiformes. Isto se deve a passagem dos íons Cl^- pelos cotransportadores NKCC1 e KCC2. No caso dos íons Br^- , esses tem baixa afinidade. pelos cotransportadores NKCC1 e passam muito pouco pelo KCC2.(54, 66)

4.1.3 Grupo Sits e Dids

Os canais de cloreto dependente de voltagem tem um papel importante no efeito do brometo nas atividades epileptiformes não- sinápticas. Investigamos como os bloqueadores destes canais atuam nas AE's não- sinápticas.

Estes bloqueadores de canais de cloreto atuam sobre os tipos CLC-2 e outros canais de cloro(49) e foram utilizados para testar o seu efeito.

As fatias (n=3) foram expostas ao ACSF zero- Ca^{++} + alto K^+ + SITS 1 mM por 30 minutos. O efeito do SITS não aconteceu próximo a sua aplicação, as mudanças nos registros começaram aproximadamente 15 minutos após sua perfusão (figura 23) .

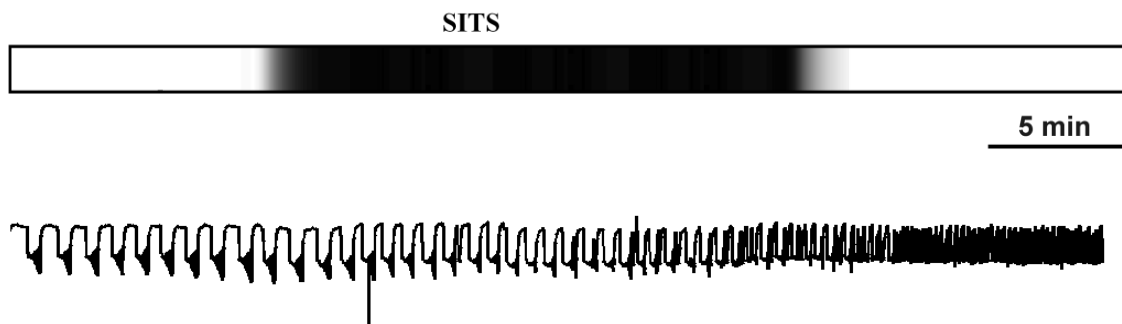


Figura 23 Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao SITS 1 mM (tempo: 20 min). Após o registro foi feita a curva com alta concentração de NaCl, simulando o registro.

O registro abaixo é característico das fatias que foram expostas ao ACSF zero- Ca^{++} + alto K^+ + DIDS 250 μM por 20 minutos (figura 24). O registro de campo (Figura 24 A) foi simultâneo ao registro do sinal óptico intrínseco (Figura 24 B).

Experimentos com DIDS (n=8) foram realizados semelhantes aos com NaBr. Demorou aproximadamente 15 min para DIDS produzir efeito semelhante da alta frequência encontrado com NaBr. Potenciais extracelulares exibiram aumento da frequência ($14,64 \pm 4,35$ vezes), porém, sem bloqueio. O efeito do DIDS na camada granular do giro dentado foi uma redução de $0,4 \pm 0,2$ vezes.

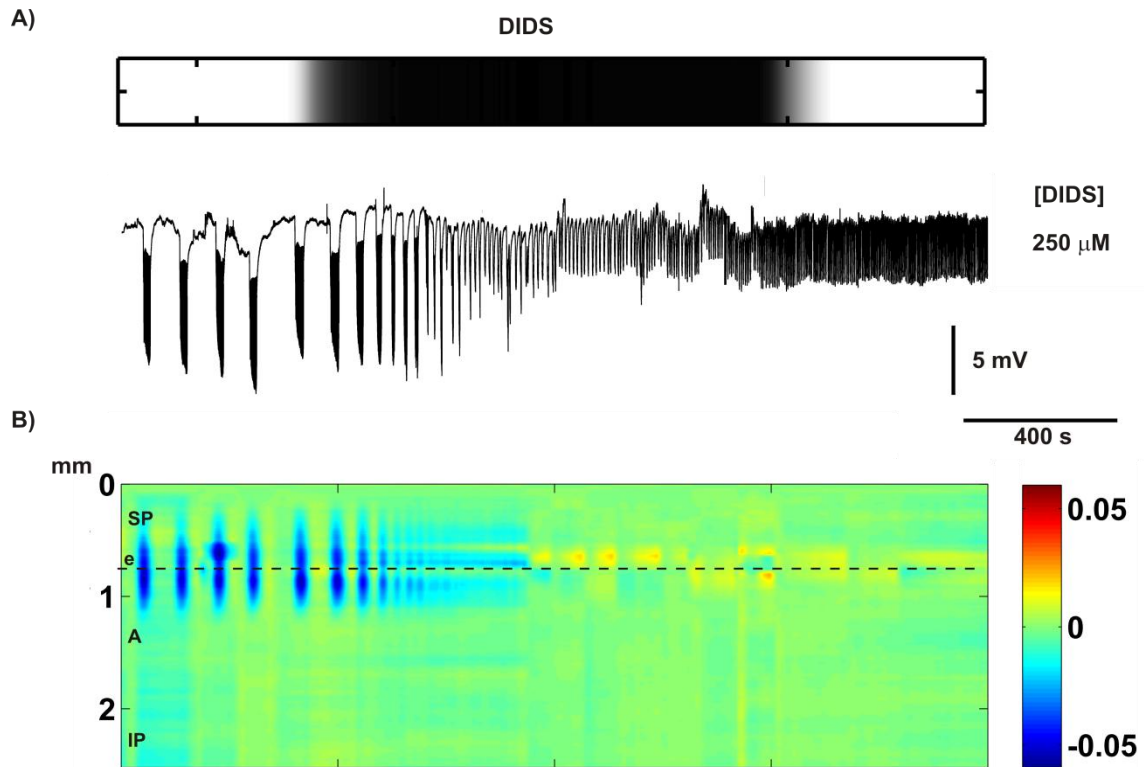


Figura 24 Em A: Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao DIDS 250 μ M (tempo: 20 min). Concomitante ao sinal elétrico foi registrado o sinal óptico intrínseco (B).

Ao reperfundirmos as fatias com ACSF zero- Ca^{++} + alto K^{+} , as AE's não retornaram ao normal (a alta frequência dos eventos persistiu). Isto se deve a alta ligação destes bloqueadores aos canais de cloreto dependente- de voltagem, mostrando efeito irreversível dos derivados de estibenos DIDS e SITS.(49-52)

4.1.4 Grupo Octanol

As fatias (n=12) foram expostas a dois tipos de tratamentos, 1^o ao NaCl 5 mM(figura 25.A) e 2^o NaBr 5 mM + Octanol 0,07 mM (figura 25.B). Comparou-se os dois tratamentos nestes registros (n= 12), foi utilizado o teste de exato de Fischer, os dois tratamentos apresentaram diferença significativa $p < 0,05$. Destes registros n=8 tiveram o bloqueio das atividades epileptiformes durante a perfusão com solução ACSF 0- Ca^{++} + alto K^{+} contendo NaBr 5 mM + Octanol 0,07 mM.

Os experimentos com o bloqueadores de *gaps* (octanol), foram realizados com o intuito de investigar a origem da alta frequência que está presente nos momentos da aplicação do NaBr. Nossas suspeitas recaem sobre as *gaps*, que devem ter suas condutâncias moduladas pelo pH intracelular. O bloqueio das *gaps*

mostrou, além da redução do evento, que também já foi observado nos estudos de Janet Stringer e colaboradores (1996), também uma redução da alta frequência

Analisando os dados, observou-se o seguinte: a frequência dos *population spikes* foi de $9.5 (\pm 2.9)$ Hz para o efeito do brometo 5 mM e de $0.47 (\pm 0.14)$ Hz para brometo+octanol (ou seja, houve redução). Esses valores foram determinados estimando os intervalos de tempo entre os *population spikes* das manobras experimentais.

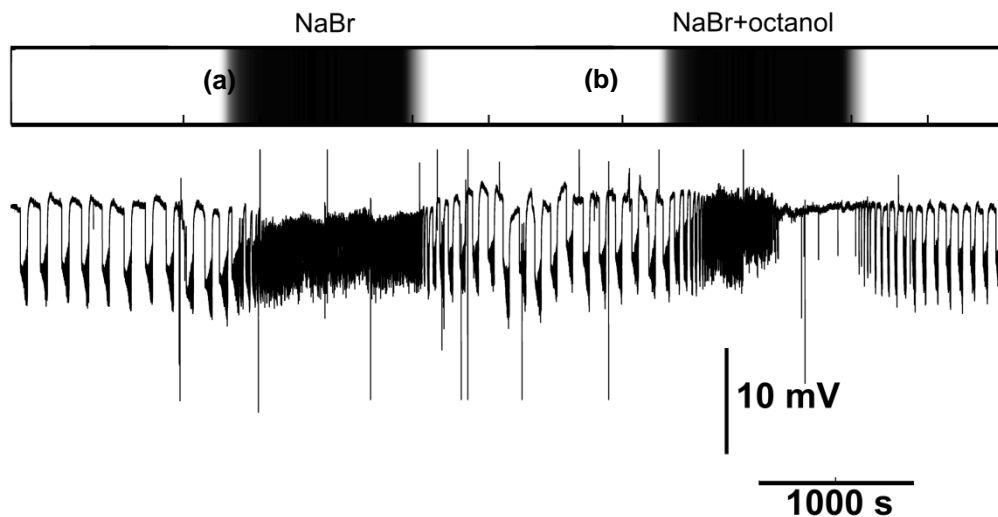


Figura 25 Exemplo de um registro de potencial elétrico extracelular de uma fatia de hipocampo de rato de 4 semanas submetido ao NaBr 5 mM (a) e após a mesma fatia foi submetida ao NaBr 5 mM + Octanol 0,07 mM (b)(tempo: 20 min).

4.1.5 Sinal Óptico Intrínseco

Adicionalmente ao estudo do potencial elétrico extracelular, foi feita a análise qualitativa do sinal óptico intrínseco (IOS) ao longo da camada granular do GD, utilizando as imagens do IOS com a finalidade de visualizar o recrutamento neuronal.

A análise do IOS possibilitou identificar o grau de recrutamento neuronal por meio do cálculo do comprimento da região envolvida nas atividades epileptiformes. Analisou-se a evolução temporal do comprimento da área de AE's durante experimentos com aplicação de NaBr 5, 7, 9 e 11 mM adicionado no ACSF zero- Ca^{++} (tempo de 20 min).

Foram capturadas as imagens dos eventos antes da perfusão com brometo de sódio, durante e após a aplicação (intervalo de tempo de 2 em 2 min). A captura

das imagens foi simultânea ao potencial elétrico durante a aplicação do brometo e SITS. Durante a exposição ao NaBr, houve uma redução no recrutamento espacial neuronal, pois a região de variação do IOS diminuiu. E após a retirada do NaBr, as AE's retornaram

Características típicas dos potenciais de campo e a imagem IOS antes e durante a aplicação do NaBr são mostrados na figura 26.a. Na figura 26.b, as imagens IOS correspondem, cada uma, a um instante no tempo indicado no traçado mostrado na parte A da figura. As imagens revelam claramente a região de recrutamento neuronal que aparece esbranquiçada, sendo, no exemplo, restrita à lâmina infra-piramidal. O comprimento da poligonal foi denominado extensão de recrutamento (ER).

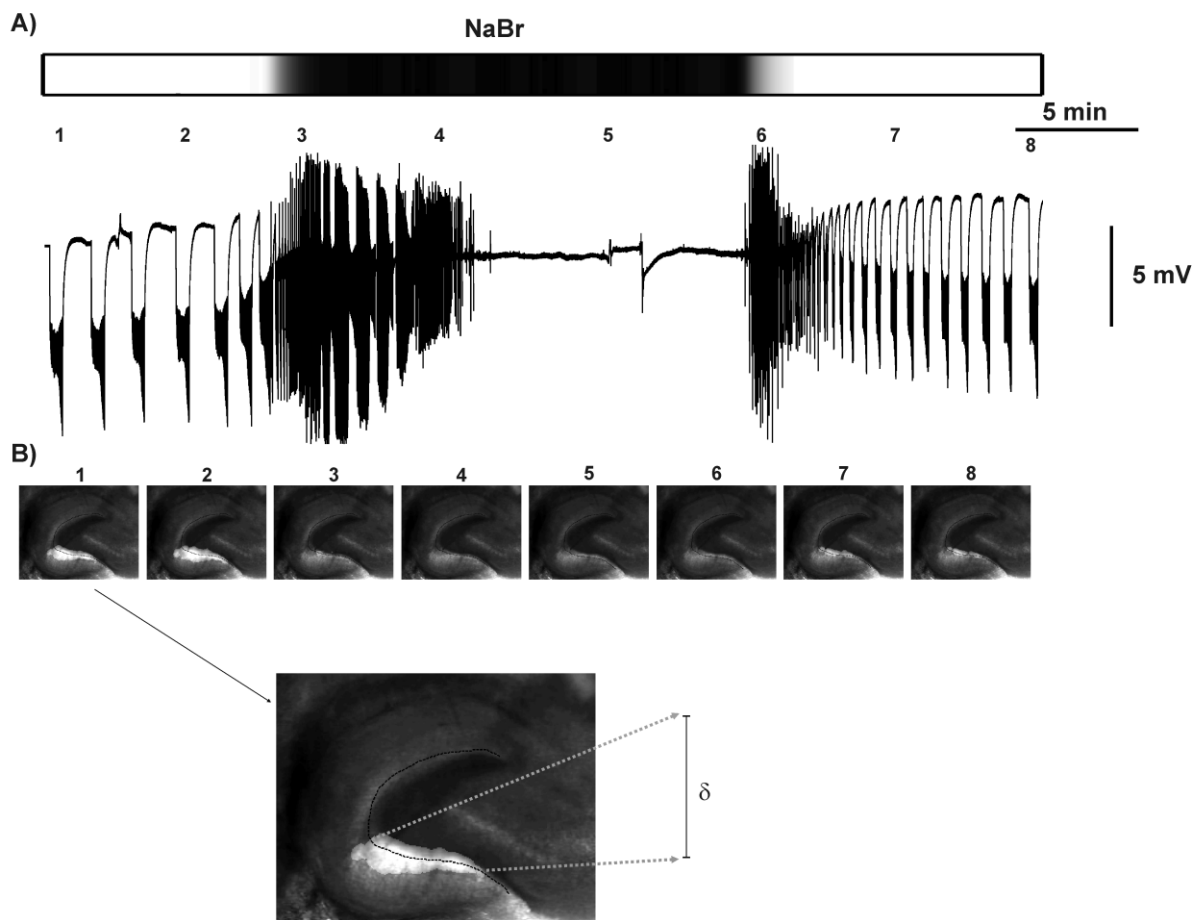


Figura 26 Potencial extracelular (A) e imagens IOS (B) simultâneas, antes, durante e depois da aplicação do NaBr (barra superior). Os instantes de tempo numerados permitem mostrar a correspondência entre o registro extracelular e as imagens IOS. A imagem IOS em destaque em (B) mostra a linha poligonal ao longo da camada granular de DG, por meio da qual exemplifica-se a quantificação de ER.

Para cada concentração (5 mM, n=3; 7 mM, n=3; 9 mM, n=3; 11 mM, n=3, a ER de cada evento foi registrada antes, durante e depois da aplicação de NaBr (figura 27)

As curvas ajustadas correspondem à composição de duas funções sigmóides:

$$ER(t) = A_1 \left[\frac{1}{1 + \exp(-\tau_1(t - tc_1))} \right] + A_2 \left[\frac{1}{1 + \exp(-\tau_2(t - tc_2))} \right]$$

Os ajustes foram feitos utilizando-se o método gradiente. Os valores foram normalizados em relação à média da ER antes da aplicação do brometo. A curva média (linha contínua) e intervalos SD das curvas (linhas tracejadas superior e inferior), indicando o intervalo de desvio padrão para cada instante de tempo, foram calculados. Para 5 mM de NaBr a redução na região recrutada ocorreu somente após ~ 2 min da aplicação de NaBr e não houve supressão total de IOS. No entanto, para as concentrações maiores, inicialmente ER diminui e, posteriormente, a atividade é completamente suprimida.

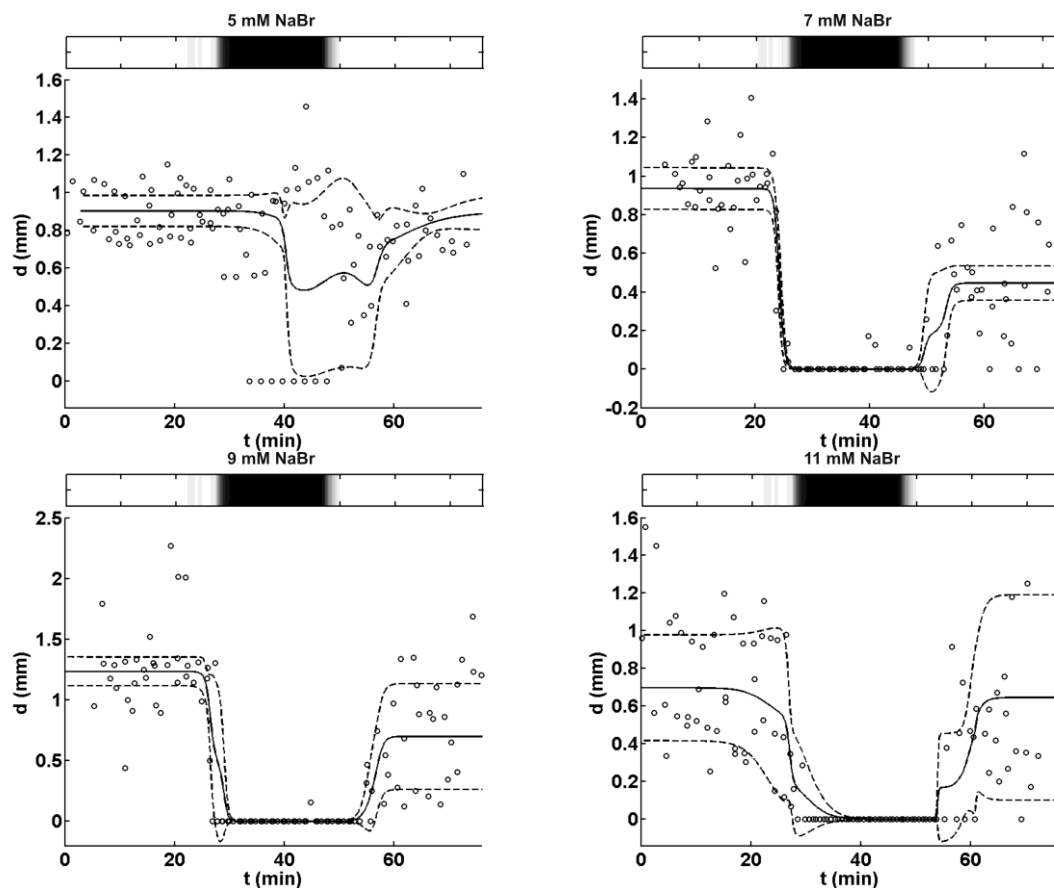


Figura 27 ER normalizada, medida para cada evento (círculos), antes, durante e depois da aplicação da NaBr (conforme barras superiores), para cada concentração (5, 7, 9 e 11 mM) investigadas.

Linhas contínuas: média de todas as curvas ajustadas para cada experimento ($n=3$ para cada concentração). Linhas tracejadas: Intervalos SD para cada instante de tempo.

Experimentos com SITS mostraram efeitos similares no parâmetro ER, no que se refere à redução do parâmetro, diferindo quanto ao tempo de resposta e à duração do efeito (figura 28).

Após ~15 min, os *bursts* foram suprimidos por uma concentração de 1 mM de SITS. O bloqueio, embora parcial teve um efeito irreversível.

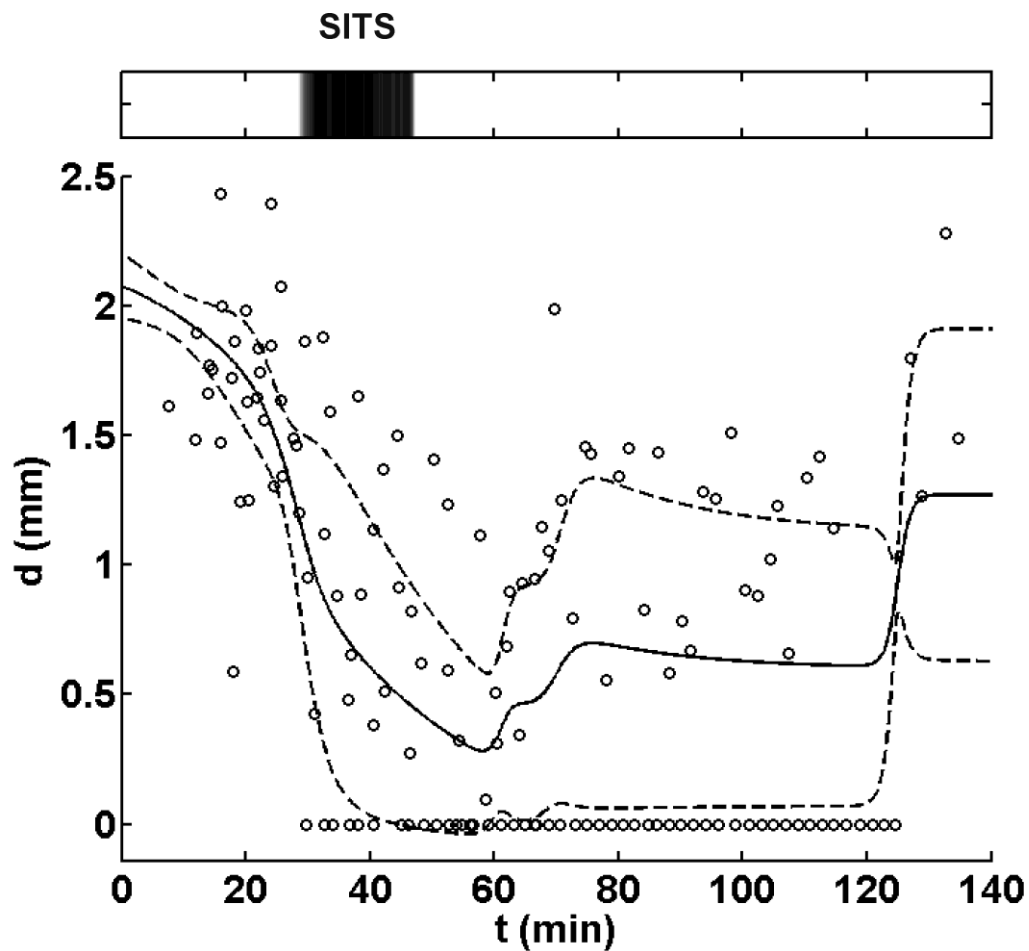


Figura 28 ER normalizada, medida para cada evento (círculos), antes, durante e depois da aplicação de SITS (conforme barra superior). Linhas contínuas: média de todas as curvas ajustadas para cada experimento ($n=3$). Linhas tracejadas: intervalo SD para cada instante de tempo.

5 DISCUSSÃO

Os Brometos foram o primeiro tratamento eficaz para epilepsia. Introduzido em 1853 por Sir Charles Locock, os brometos mantiveram-se úteis como opção terapêutica por aproximadamente 60 anos. Com o advento de tratamentos menos tóxicos e mais eficazes, o uso de brometos tornou-se menos usual.(82) Porém, os brometos permanecem como uma ferramenta valiosa no tratamento de epilepsias refratárias para as recentes drogas antiepilépticas, como refratária a crises tônico-clônicas e epilepsias mioclônicas severas em crianças.(41, 83, 84) No entanto, a atividade farmacológica dos brometos permanecem sem uma completa elucidação.

O Brometo também é eficaz bloqueando a atividade epileptiforme não-sináptica. A atividade epileptiforme não-sináptica é particularmente pronunciada no giro dentado. Os experimentos atuais foram projetados para identificar os mecanismos de ação NaBr em atividade epileptiformes não- sinápticas induzidas no giro dentado.

A hipótese mais aceitável para explicar o mecanismo do brometo para o bloqueio da atividade epiléptica é o aumento da hiperpolarização neuronal, mediadas por inibidores pós-sinápticos.(45) O efeito antiepiléptico do brometo acredita ser devido à potencialização dos potenciais pós-sinápticos inibitórios por GABA, desde que íons Br^- atravesse as membranas celulares mais rapidamente que Cl^- , realçando as correntes ativadas por GABA e levando a grande hiperpolarização. Mas não só os canais de cloreto ativados por GABA são mais permeáveis para o brometo, os canais de cloreto dependente de voltagem são também mais permeáveis ($\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$; 1.98:1.46:1:0.44).(41, 42) Esse fato justifica porque o brometo tem também efeitos sobre as atividades epileptiformes não-sinápticas.

Em nosso estudo, obtivemos o bloqueio da atividade epileptiforme pelo NaBr em concentrações superiores à 5 mM. O gráfico da relação concentração-resposta (concentração do fármaco x tempo de supressão da atividade epileptiforme) mostra que com 7 mM houve o bloqueio da atividade epileptiforme em 70% dos registros; 9 mM é a concentração suficiente para a completa supressão da AE's e com 11 mM observamos que houve saturação da resposta. Portanto, o efeito do brometo de sódio é concentração dependente. Meierkord e colaboradores (2000) observaram o bloqueio consistente das AE's, quando fatias de hipocampo banhadas com baixa solução de Ca^{++} foram perfundidas com NaBr na concentração de 11 mM

Observaram que, em CA1 o NaBr reduz a frequência ou bloqueia as descargas. No entanto, no giro dentado, observou-se que a frequência aumenta e só depois de aumentar o bloqueio ocorre. Em todos os experimentos realizados no presente trabalho, este aumento na frequência dos eventos que precederam o bloqueio foi típico efeito de NaBr. A quantificação dos parâmetros relacionados com eventos epileptiformes não- sinápticos antes e depois do bloqueio NaBr (Figura 21) mostra que a característica básica dos eventos em termos de dinâmica e amplitude de tempo não são dramaticamente afetadas pela NaBr. Esta reversibilidade do efeito NaBr indica que na faixa de 7-9 mM NaBr é facilmente revertido o efeito e não afetam de forma permanente a atividade do tecido neuronal. Meierkord e colaboradores (2000) utilizaram as mesmas concentrações de NaBr e obtiveram para a concentração de 5 mM uma redução de 25% na frequência dos eventos epileptiformes. Em 7 mM houve uma redução de 50% e bloqueio em uma fatia, já em 9 mM aconteceu uma redução de 80% e NaBr 11 mM bloqueou completamente as atividades epileptiformes em todas as fatias. As diferenças deste trabalho, com o nosso estudo incluem: 1. estes autores não zeraram o cálcio do ACSF, mas utilizaram menor concentração deste íon para indução da atividade epileptiforme; 2. o estudo foi realizado na área de CA1 do hipocampo e não no giro dentado. Talvez estes fatores possam explicar as diferenças de resultados entre o presente trabalho e o de Meierkord e colaboradores (2000).

A maioria dos trabalhos estudou o efeito do brometo em modelos sinápticos. Meierkord e colaboradores (2000) utilizaram NBQX (bloqueador de receptor glutamatérgico, AMPA) e APV (bloqueador de receptor NMDA) em culturas de neurônios para isolar potenciais pós-sinápticos inibitórios mediados por GABA. Suzuki e colaboradores (1994) utilizaram GABA e sugeriram que o brometo potencializa as correntes ativadas por GABA em uma concentração terapêutica de 10 mM a 20 mM, causando uma grande hiperpolarização induzida por este. No estudo de Meierkord e colaboradores (2000) através de um protocolo de estimulação pulso-pareado, usado para monitorar a eficácia da inibição GABAérgica em concentrações de 5 mM de NaBr, foi verificado um aumento significativo na amplitude inibitória pós-sináptica em culturas de neurônios hipocampais. Em células ganglionares o brometo de sódio causou hiperpolarização quando foi feita uma substituição equimolar de cloreto de sódio (112 mM) por NaBr em ACSF. Neste estudo, também foram observados efeitos excitatórios sinápticos mínimos. No

entanto, no presente estudo, a ausência de Ca^{++} na solução de banho induz a inativação dos receptores GABAérgicos. Outro mecanismo que foi proposto foi inibição da enzima anidrase carbônica. (75)No entanto, os achados de Meierkord e colaboradores (2000), mostram que o NaBr não alterou a linha de base do pH e aumentou a alcalose induzida por estímulo, o que seria melhor do que pró-anticonvulsivante. Portanto, outro mecanismo deve ser responsável pelo bloqueio. Pode-se esperar que a potencialização observada da ação inibitória dos receptores GABAérgicos por brometo pode também ter lugar para os canais de cloreto não dependente de neurotransmissão. Essa foi a lógica que norteou o projeto dos experimentos realizados no presente trabalho. Suzuki e colaboradores (1994) estimaram que a taxa de permeabilidade relativa de canais GABA_A para Br^- com relação a Cl^- é 1.51. Segundo os autores, esta maior permeabilidade relativa seria responsável pelo aumento observado no GABA_A através das correntes ativadas por GABA elucidadas pela aplicação de brometo. Estimou-se que a concentração terapêutica do Br^- (20 mM) corresponde a um aumento 1,30 vezes das correntes externas (*Holding Potential* 0 mV), o suficiente para hiperpolarizar o potencial de membrana.

No entanto, dadas as circunstâncias da indução atividade epileptiforme não-sináptica, o efeito unicamente na permeabilidade parece não ser suficiente para o bloqueio. Isto pode ser deduzido pelo modelo matemático de Almeida e colaboradores (2008). De acordo com o modelo e as simulações, o efeito fundamental de aumentar a concentração de K^+ extracelular para induzir a atividade epileptiforme não-sináptica, é concomitante a redução do potencial de Nernst Cl^- . Esta redução é promovida pela função de interação dos cotransportadores NKCC e KCC. O primeiro é responsável pelo influxo de Cl^- , e o último pela sua extrusão. Na situação da indução da atividade epileptiforme não-sináptica, as simulações mostram que o fluxo de Cl^- , por NKCC em relação ao seu efluxo por KCC, é mais eficaz e o efeito líquido é um acúmulo de Cl^- no espaço intracelular. Esse acúmulo é responsável pelo potencial de Nernst Cl^- superar o potencial de membrana. O efluxo de Cl^- é capaz de induzir a despolarização neuronal progressiva, constituindo a característica básica do estado interictal. Com base nesta dinâmica, podemos inferir que o efeito do Br^- não é apenas no potencial de membrana, por meio de sua maior permeabilidade em relação ao Cl^- induzindo hiperpolarização, seria também estender o estado interictal. No entanto, isso não está de acordo com nossas descobertas no

campo do giro dentado, onde a marca registrada do efeito NaBr foi o aumento da frequência seguido pelo bloqueio.

Podemos enfatizar que a hiperpolarização pelo Br^- só seria responsável pelo prolongamento do estado interictal, testamos o efeito do incremento da concentração extracelular Cl^- em 15 mM (Figura 22A). No experimento de 11 mM, substituição Cl^- por Br^- , considerando presumidamente a permeabilidade do canal de cloreto aumenta de 1,51, o incremento correspondente Cl^- seria de 5,5 mM. Portanto, efeito esperado seria menor ao observado com 15 mM de Cl^- . Com adição de 15 mM de NaCl, um prolongamento transitório do estado interictal foi de fato observado. Além disso, no final da perfusão, a atividade epileptiforme não-sináptica mostrou uma tendência a voltar para a duração do estado interictal anterior à perfusão. O que pode ser inferido a partir desta constatação é que o cloreto tem permeabilidade através da membrana, por meio de canais, cotransportadores e outros processos, isto promove um equilíbrio iônico entre os espaços intra e extracelulares e reduz o gradiente de cloreto e também o seu efeito. Para sustentar o efeito de bloqueio, Br^- não deve acumular-se no espaço intracelular. Portanto, pode-se supor que Br^- pode não substituir Cl^- no cotransportador NKCC e, por outro lado, pode substituir pouco o Cl^- no cotransportador KCC. Na verdade, estes dados estão de acordo com relatos que mostram Br^- substitui pouquíssimo o Cl^- no NKCC e parcialmente no KCC.(54, 56, 66)

Entretanto, os experimentos com NaCl e NaBr, quando comparados, mostram, no primeiro caso, que a atuação do Cl^- é, inicialmente, um bloqueio, mas que é seguido de um retorno das atividades epileptiformes, mesmo que se mantendo a perfusão com o sal, o mesmo já não acontece com o NaBr. As perfusões com este sal mostram que o bloqueio se dá de forma permanente, uma vez mantida a perfusão. Se compararmos os dois sais, a diferença entre eles está justamente na substituição do cloreto pelo brometo. O primeiro, sabidamente, transportável pelos cotransportadores, deve resultar em um reequilíbrio, permitindo influxo Cl^- e redução de seu potencial de Nernst. Isso conduziu a uma despolarização com retorno das atividades. Já a perfusão com o NaBr, considerando-se que o brometo não tem afinidade com a enzima cotransportadora, não apresentará influxo desse íon e o potencial de Nernst mais negativo provavelmente será mantido. Nesta condição, o bloqueio das atividades epileptiformes também ficará mantido. Portanto, a comparação destes dois

experimentos, que deverá ser melhor ilustrada com simulações computacionais, aponta, como papel importante para o mecanismo bloqueador do brometo, a baixa afinidade desse íon nos sítios de ligação de cloreto nas enzimas cotransportadoras, com destaque para os do tipo NKCC1.

Trabalhando com a hipótese de que deve haver um efeito mais complexo do Br^- sobre os canais de cloreto, especificamente a competição entre Cl^- e Br^- , testamos o efeito de um bloqueio parcial dos canais com bloqueadores de canais de cloreto (SITS e DIDS) durante a atividade epileptiforme não- sináptica (Figuras 23 e 24). Estes bloqueadores foram usados em uma concentração de 50% do bloqueio. O aumento da frequência observada está de acordo com o aumento da mesma frequência anterior ao bloqueio epileptiforme não-sináptico com NaBr. Esta observação sugere que o aumento da frequência pode ser devido ao efeito competitivo do Br^- sobre os canais de cloreto, reduzindo a permeabilidade Cl^- . Os resultados deste estudo permitem inferir que o efeito antiepiléptico do Br^- sobre as AE's não-sinápticas pode ocorrer através das propriedades únicas deste ânion: i) substitui muito pouco Cl^- nos cotransportadores NKCC; ii) substitui parcialmente Cl^- nos cotransportadores KCC; seguido de uma: iii) maior permeabilidade nos canais de cloreto do que Cl^- ; iv) competição com Cl^- nos canais de cloreto, reduzindo a sua permeabilidade. A interação do Br^- com os cotransportadores evita sua acumulação no espaço intracelular, sustentando seu gradiente transmembrânico, favorável à ação de hiperpolarização no potencial de membrana. O canal de cloreto é mais permeável aos íons Br^- , isso aumenta a sua ação. Essa ação é ainda potencializada quando há competição do Br^- com Cl^- , o Br^- reduz a permeabilidade do canal para este íon. Quando ocorre a acumulação intracelular de Cl^- , esse é o principal responsável pelo aumento da excitabilidade nesta situação, típica de várias condições que sustentam as crises, o efeito depressor do Cl^- é extremamente eficaz.

Se o brometo também pudesse substituir o cloreto sobre o CCCs, nenhuma objeção poderia ser considerada no pressuposto que brometo pudesse também acumular intracelularmente. Uma vez que isso não acontece, o mecanismo antiepiléptico do brometo não é o único porque o brometo reforça o potencial Nernst do cloreto levando hiperpolarização, mas também não poderia pois não tem afinidade com a enzima NKCC.

Já os experimentos com os bloqueadores de *gaps* (N-octanol), o que pretendemos mostrar foi a origem da alta frequência que surge no momento da

aplicação do NaBr. Nossas suspeitas recaem sobre as *gaps*, que devem ter suas condutâncias moduladas pelo pH intracelular. O bloqueio das *gaps* tem nos mostrado, além da redução do evento, que também já foi observado pela Janet Stringer e colaboradores (1996), também uma redução da alta frequência. Na nossa teoria, o bloqueio das *gaps*, deverá reduzir a alteração que o pH tem sobre a abertura das *gaps*. Achados da literatura mostram uma grande confluência de *gaps* do tipo axo-axônicas.

6 CONCLUSÕES

- 1- O efeito do brometo de sódio é concentração- dependente, obtendo-se o bloqueio das AE's pelo NaBr em concentrações superiores à 5 mM.
- 2- Há possível envolvimento dos canais de cloreto dependente de voltagem;
- 3- O NaBr tem pouca afinidade pelos cotransportadores NKCC1 e substitui parcialmente Cl^- nos cotransportadores KCC2.
- 4- O efeito de Br^- não é apenas no potencial de membrana, por meio de sua maior permeabilidade em relação ao Cl^- induzindo hiperpolarização, mas apresenta também uma maior permeabilidade aos canais de cloreto dependente de voltagem.
- 5- O aumento da frequência das descargas pode ser devido ao efeito competitivo do Br^- sobre os canais de cloreto, reduzindo a permeabilidade Cl^- .
- 6- A origem da alta frequência nos registros com o brometo está relacionada com as *gaps*.
- 7- O registro do sinal óptico intrínseco permitiu visualizar a inibição da atividade epileptiforme envolvendo as regiões do giro dentado, após a perfusão com NaBr.

Em síntese, estas observações permitem considerar que o mecanismo de efeito antiepiléptico do brometo poderia ser dividido em três ações principais:

- a) a compensação da acumulação de cloreto por meio de seu efeito hiperpolarizante através dos canais de cloreto;
- b) o seu efeito antagonizado sobre o cloreto através dos canais, devido a uma suposta competição com o cloreto;
- c) a baixa afinidade da enzima NKCC para o brometo;
- d) a competição com Cl^- nos canais de cloreto, reduzindo a sua permeabilidade.

Confirmando-se estes resultados, uma combinação terapêutica poderá ser realizada utilizando a bumetanida e brometo visando à redução da incidência de crise. Simulações de Almeida e colaboradores (2011) apontam para a combinação terapêutica com a: administração da bumetanida (reduziria a concentração de cloreto intracelular) e brometo (reforçaria a negatividade E_{GABA}), onde os efeitos sistêmicos da bumetanida e brometo são descritos. Embora agindo de acordo com diferentes mecanismos, ambos os efeitos reduzem a excitabilidade neuronal. Uma vez que os efeitos são complementares, as doses utilizadas de bumetanida e brometo podem ser reduzidos, e conseqüentemente, seus efeitos colaterais também.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na supressão das atividades epileptiformes pelo NaBr, pretendemos seguir nesta linha de pesquisa de investigação desenvolvendo os seguintes estudos:

- 1º Avaliar por técnica de *patch-clamp*, os canais de cloreto envolvidos no mecanismo de ação do Br⁻;
- 2º Avaliar o efeito do brometo em fatias de hipocampo de ratos submetidos ao tratamento com pilocarpina e em tecido hipocampal obtido de pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso;
- 3º Simulações computacionais auxiliarão investigar melhor os mecanismos celulares envolvidos (influência de: correntes de membrana iônica, bomba de Na⁺ / K⁺-ATPase, cotransportadores e trocadores envolvidos) no presente estudo e que também influenciam na epilepsia.
- 4º Além disso, temos interesse de ampliar estes estudos: tratando animais submetidos ao *status* por pilocarpina com brometo de sódio e bumetanida;
- 5º Após os testes experimentais pretendemos aplicar na clínica o uso de brometos associado à bumetanida.

REFERÊNCIAS

1. Al-Noori S, Pierson MG, Swan JW. **Bases celulares das epilepsias**. In: Da Costa JC, Palmira A, Yacubian EMT, Cavalheiro EA, editors. Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos. Lemos ed. São Paulo; 1998. p. 43-60.
2. Avanzini G, Franceschetti S. Cellular biology of epileptogenesis. **Lancet Neurol**. 2(1):33-42, 2003.
3. Yacubian EMT. **Tratamento medicamentoso das epilepsias**. 2 ed. São Paulo: Editora Lemos; 2004. p. 318.
4. ENGEL J. **Seizures and Epilepsy**. 1 ed. Philadelphia: Davis Company; 1989
5. Guerreiro AM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I. **Considerações Gerais**. Epilepsia. São Paulo: Editora Lemos; 2000. p. 419.
6. Engel JJ, Dichter MA, Schwartzkroin PA. **Basic Mechanisms of human epilepsy**. Wikis PLWe, editor: 2008.
7. Engel J, Jr. Epilepsy and seizure disorder. **Epilepsia**. 46(8):1333, 2005.
8. Kandel Erik R. , Schwartz James H. , M. JT. **Principles of Neural Science**. 4 ed. United States of America: Mc Graw- Hill; 2000.
9. Jefferys JGR. **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkis; 2008.
10. Rogawski MA, Porter RJ. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. **Pharmacol Rev**. 1990;42(3):223-86.
11. Oka E, Ohtsuka Y, Yoshinaga H, Murakami N, Kobayashi K, Ogino T. Prevalence of childhood epilepsy and distribution of epileptic syndromes: a population-based survey in Okayama, Japan. **Epilepsia**.47(3):626-30, 2006.
12. Chu-Shore CJ, Thiele EA. New drugs for pediatric epilepsy. **Semin Pediatr Neurol**. 17(4):214-23, 2010.
13. Dudley RW, Penney SJ, Buckley DJ. First-drug treatment failures in children newly diagnosed with epilepsy. **Pediatr Neurol**. 2009 Feb;40(2):71-7.
14. White HS, Smith MD, Wilcox KS. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. **Int Rev Neurobiol**. 2007;81:85-110.
15. McBain CJ, Traynelis SF, Dingledine R. Regional variation of extracellular space in the hippocampus. **Science**. 1990;249(4969):674-7.

16. Joy RM, Albertson TE. Convulsant-induced changes in perforant path-dentate gyrus excitability in urethane anesthetized rats. **J Pharmacol Exp Ther.** 1988;246(3):887-95.
17. Stringer JL, Lothman EW. During afterdischarges in the young rat in vivo extracellular potassium is not elevated above adult levels. **Brain Res Dev Brain Res.** 1996;91(1):136-9.
18. Bilkey DK, Schwartzkroin PA. Variation in electrophysiology and morphology of hippocampal CA3 pyramidal cells. **Brain Res.** 1990;514(1):77-83.
19. Pan E, Stringer JL. Burst characteristics of dentate gyrus granule cells: evidence for endogenous and nonsynaptic properties. **J Neurophysiol.** 1996;75(1):124-32.
20. Johnston D, Brown TH. Giant synaptic potential hypothesis for epileptiform activity. **Science.** 1981;211(4479):294-7.
21. Dudek FE, Kim YI, Bouskila Y. Electrophysiology of the suprachiasmatic nucleus: synaptic transmission, membrane properties, and neuronal synchronization. **J Biol Rhythms.** 1993;8 Suppl:S33-7.
22. Jefferys JG, Haas HL. Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. **Nature.** 1982;300(5891):448-50.
23. Stringer JL, Lothman EW. Maximal dentate gyrus activation: characteristics and alterations after repeated seizures. **J Neurophysiol.** 1989;62(1):136-43.
24. Xiong ZQ, Stringer JL. Sodium pump activity, not glial spatial buffering, clears potassium after epileptiform activity induced in the dentate gyrus. **J Neurophysiol.** 2000;83(3):1443-51.
25. Taylor CP, Dudek FE. Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. **Science.** 1982;218(4574):810-2.
26. Taylor CP, Dudek FE. Synchronization without active chemical synapses during hippocampal afterdischarges. **J Neurophysiol.** 1984;52(1):143-55.
27. Hablitz JJ. Altered burst responses in hippocampal CA3 neurons injected with EGTA. **Exp Brain Res.** 1981;42(3-4):483-5.
28. Dudek FE, Snow RW, Taylor CP. Role of electrical interactions in synchronization of epileptiform bursts. **Adv Neurol.** 1986;44:593-617.
29. Snow RW, Dudek FE. Evidence for neuronal interactions by electrical field effects in the CA3 and dentate regions of rat hippocampal slices. **Brain Res.** 1986;367(1-2):292-5.
30. Traynelis SF, Dingledine R. Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. **J Neurophysiol.** 1988;59(1):259-76.

31. Roper SN, Obenaus A, Dudek FE. Osmolality and nonsynaptic epileptiform bursts in rat CA1 and dentate gyrus. **Ann Neurol.** 1992;31(1):81-5.
32. Pan E, Stringer JL. Role of potassium and calcium in the generation of cellular bursts in the dentate gyrus. **J Neurophysiol.** 1997;77(5):2293-9.
33. Schweitzer JS, Patrylo PR, Dudek FE. Prolonged field bursts in the dentate gyrus: dependence on low calcium, high potassium, and nonsynaptic mechanisms. **J Neurophysiol.** 1992;68(6):2016-25.
34. Dietzel I, Heinemann U, Hofmeier G, Lux HD. Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. **Exp Brain Res.** 1980;40(4):432-9.
35. Dietzel I, Heinemann U, Hofmeier G, Lux HD. Stimulus-induced changes in extracellular Na⁺ and Cl⁻ concentration in relation to changes in the size of the extracellular space. **Exp Brain Res.** 1982;46(1):73-84.
36. Lux HD, Heinemann U, Dietzel I. Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. **Adv Neurol.** 1986;44:619-39.
37. Traynelis SF, Dingledine R. Role of extracellular space in hyperosmotic suppression of potassium-induced electrographic seizures. **J Neurophysiol.** 1989;61(5):927-38.
38. Schweitzer JS, Wang H, Xiong ZQ, Stringer JL. pH Sensitivity of non-synaptic field bursts in the dentate gyrus. **J Neurophysiol.** 2000;84(2):927-33.
39. Xiong ZQ, Saggau P, Stringer JL. Activity-dependent intracellular acidification correlates with the duration of seizure activity. **J Neurosci.** 2000;20(4):1290-6.
40. Xiong ZQ, Stringer JL. Regulation of extracellular pH in the developing hippocampus. **Brain Res Dev Brain Res.** 2000;122(2):113-7.
41. Franciolini F, Nonner W. Anion and cation permeability of a chloride channel in rat hippocampal neurons. **J Gen Physiol.** 1987;90(4):453-78.
42. Takeuchi A, Takeuchi N. Anion permeability of the inhibitory post-synaptic membrane of the crayfish neuromuscular junction. **J Physiol.** 1967;191(3):575-90.
43. Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. **Neuron.** 2009;61(6):820-38.
44. Jentsch TJ, Friedrich T, Schriever A, Yamada H. The CLC chloride channel family. **Pflugers Arch.** 1999;437(6):783-95.
45. Clayton GH, Staley KJ, Wilcox CL, Owens GC, Smith RL. Developmental expression of C1C-2 in the rat nervous system. **Brain Res Dev Brain Res.** 1998;108(1-2):307-18.

46. Furukawa T, Ogura T, Katayama Y, Hiraoka M. Characteristics of rabbit ClC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. **Am J Physiol**. 1998;274(2 Pt 1):C500-12.
47. Pusch M, Jentsch TJ. Molecular physiology of voltage-gated chloride channels. **Physiol Rev**. 1994;74(4):813-27.
48. Jordt SE, Jentsch TJ. Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. **EMBO J**. 1997;16(7):1582-92.
49. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. **Physiol Rev**. 2002;82(2):503-68.
50. Cabantchik ZI, Greger R. Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes. **Am J Physiol**. 1992;262(4 Pt 1):C803-27.
51. Fan SF, Yazulla S. Electrogenic hyperpolarization-elicited chloride transporter current in blue cones of zebrafish retinal slices. **J Neurophysiol**. 1997;77(3):1447-59.
52. Vaca L. SITS blockade induces multiple subconductance states in a large conductance chloride channel. **J Membr Biol**. 1999;169(1):65-73.
53. Bikson M, Ghai RS, Baraban SC, Durand DM. Modulation of burst frequency, duration, and amplitude in the zero-Ca(2+) model of epileptiform activity. **J Neurophysiol**. 1999;82(5):2262-70.
54. Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. **Trends Neurosci**. 2003;26(4):199-206.
55. Delpire E. Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. **News Physiol Sci**. 2000;15:309-12.
56. Ehrlich I, Lohrke S, Friauf E. Shift from depolarizing to hyperpolarizing glycine action in rat auditory neurones is due to age-dependent Cl⁻ regulation. **J Physiol**. 1999;520(1):121-37.
57. Staley KJ, Proctor WR. Modulation of mammalian dendritic GABA(A) receptor function by the kinetics of Cl⁻ and HCO₃⁻ transport. **J Physiol**. 1999;519 (3):693-712.
58. Li H, Tornberg J, Kaila K, Airaksinen MS, Rivera C. Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. **Eur J Neurosci**. 2002;16(12):2358-70.
59. Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. **Nature**. 1999;397(6716):251-5.

60. Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipila S, et al. Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. **J Neurosci**. 2004;24(19):4683-91.
61. Khirug S, Yamada J, Afzalov R, Voipio J, Khiroug L, Kaila K. GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. **J Neurosci**. 2008;28(18):4635-9.
62. Plotkin MD, Snyder EY, Hebert SC, Delpire E. 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**. 1997;33(6):781-95.
63. Misgeld U, Deisz RA, Dodt HU, Lux HD. The role of chloride transport in postsynaptic inhibition of hippocampal neurons. **Science**. 1986;232(4756):1413-5.
64. Chesler M. Regulation and modulation of pH in the brain. **Physiol Rev**. 2003;83(4):1183-221.
65. Payne JA. Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for $[K^+]_o$ regulation. **Am J Physiol**. 1997;273(5 Pt 1):C1516-25.
66. Geck P, Pietrzyk C, Burckhardt BC, Pfeiffer B, Heinz E. Electrically silent cotransport on Na^+ , K^+ and Cl^- in Ehrlich cells. **Biochim Biophys Acta**. 1980;600(2):432-47.
67. Russell JM. Sodium-potassium-chloride cotransport. **Physiol Rev**. 2000;80(1):211-76.
68. Almeida AC, Scorza FA, Rodrigues AM, Arida RM, Carlesso FN, Batista AG, et al. Combined effect of bumetanide, bromide, and GABAergic agonists: an alternative treatment for intractable seizures. **Epilepsy Behav**. 2011;20(1):147-9.
69. Delpire E, Days E, Lewis LM, Mi D, Kim K, Lindsley CW, et al. Small-molecule screen identifies inhibitors of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2009;106(13):5383-8.
70. Garay RP, Nazaret C, Hannaert PA, Cragoe EJ, Jr. Demonstration of a $[K^+, Cl^-]$ -cotransport system in human red cells by its sensitivity to [(dihydroindenyl)oxy]alkanoic acids: regulation of cell swelling and distinction from the bumetanide-sensitive $[Na^+, K^+, Cl^-]$ -cotransport system. **Mol Pharmacol**. 1988;33(6):696-701.
71. Ernst JP, Doose H, Baier WK. Bromides were effective in intractable epilepsy with generalized tonic-clonic seizures and onset in early childhood. **Brain Dev**. 1988;10(6):385-8.
72. Joynt RJ. The use of bromides for epilepsy. **Am J Dis Child**. 1974;128(3):362-3.

73. Oguni H, Hayashi K, Oguni M, Mukahira A, Uehara T, Fukuyama Y, et al. Treatment of severe myoclonic epilepsy in infants with bromide and its borderline variant. **Epilepsia**. 1994;35(6):1140-5.
74. Steinhoff BJ, Kruse R. Bromide treatment of pharmaco-resistant epilepsies with generalized tonic-clonic seizures: a clinical study. **Brain Dev**. 1992;14(3):144-9.
75. Woodbury DM, C.E. P, . Bromides. In: Woodbury DM, J.K. P, Pippenger CE, editors. **Antiepileptic drugs**. 2 ed. New York: Editora Raven; 1972. p. 519-27.
76. Boenigk HE, Lorenz JH, Jurgens U. [Bromides--today still useful as antiepileptic substances?]. **Nervenarzt**. 1985;56(10):579-82.
77. Woody RC. Bromide therapy for pediatric seizure disorder intractable to other antiepileptic drugs. **J Child Neurol**. 1990 Jan;5(1):65-7.
78. Levy HR, Mattson HR, Meldrum SB. Other antiepileptic drugs. In: Fritz ED, editor. **Antiepileptic Drugs**. New York: Raven Press; 1995. p. 949-51.
79. Korinthenberg R, Burkart P, Woelfle C, Moenting JS, Ernst JP. Pharmacology, efficacy, and tolerability of potassium bromide in childhood epilepsy. **J Child Neurol**. 2007;22(4):414-8.
80. Ryan M, Baumann RJ. Use and monitoring of bromides in epilepsy treatment. **Pediatr Neurol**. 1999;21(2):523-8.
81. Takayanagi M, Yamamoto K, Nakagawa H, Munakata M, Kato R, Yokoyama H, et al. Two successful cases of bromide therapy for refractory symptomatic localization-related epilepsy. **Brain Dev**. 2002;24(3):194-6.
82. Meierkord H, Grunig F, Gutschmidt U, Gutierrez R, Pfeiffer M, Draguhn A, et al. Sodium bromide: effects on different patterns of epileptiform activity, extracellular pH changes and GABAergic inhibition. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 2000;361(1):25-32.
83. Montoya GA, Riker WK. A study of the actions of bromide on frog sympathetic ganglion. **Neuropharmacology**. 1982;21(6):581-5.
84. Suzuki S, Kawakami K, Nakamura F, Nishimura S, Yagi K, Seino M. Bromide, in the therapeutic concentration, enhances GABA-activated currents in cultured neurons of rat cerebral cortex. **Epilepsy Res**. 1994;19(2):89-97.
85. Nicholson C, Hounsgaard J. Diffusion in the slice microenvironment and implications for physiological studies. **Fed Proc**. 1983;42(12):2865-8.
86. Holtkamp M, Buchheim K, Siegmund H, Meierkord H. Optical imaging reveals reduced seizure spread and propagation velocities in aged rat brain in vitro. **Neurobiol Aging**. 2003;24(2):345-53.

87. Andrew RD, Adams JR, Polischuk TM. Imaging NMDA- and kainate-induced intrinsic optical signals from the hippocampal slice. **J Neurophysiol.** 1996;76(4):2707-17.
88. Almeida A-CG, Rodrigues AM, Duarte MA, Silveira Gd, Arida RM, C.Costa J, et al. **Biophysical Aspects of the Nonsynaptic Epileptiform Activity.** In: Epilepsia,.2011. Book 6. (Kaneez FS ed.) Intech OAP. In press.

ANEXOS

ANEXO A – Mechanisms By Which Sodium Bromide Blocks Nonsynaptic Epileptiform Activity

**MECHANISMS BY WHICH SODIUM BROMIDE BLOCKS NONSYNAPTIC
EPILEPTIFORM
ACTIVITY**

Corresponding Author: Prof. Antônio-Carlos Guimarães Almeida

Dear Dr. Almeida,

**Your submission entitled "MECHANISMS BY WHICH SODIUM BROMIDE
BLOCKS
NONSYNAPTIC EPILEPTIFORM ACTIVITY" has been received for consideration
in
Neuroscience.**

**You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on
to EES for Neuroscience (<http://ees.elsevier.com/nsc/>) as an author.**

**Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon
receive an e-mail with this number for your reference.**

**Thank you for submitting your manuscript to Neuroscience. Should you have
any questions, please feel free to contact our office.**

Kind regards,

**Stephen G. Lisberger, Chief Editor
Etienne Hirsch, Associate Editor
Neuroscience**

**Neuroscience, Editorial Office
Elsevier
525 B Street, Suite 1800
San Diego, CA 92101-4495
USA
FAX: 619-699-6855
E-mail: neuroscience@journal-office.com**

MECHANISMS BY WHICH SODIUM BROMIDE BLOCKS NONSYNAPTIC EPILEPTIFORM ACTIVITY

Fernanda N Carlesso^{1,2}; Antônio M Rodrigues¹; Máisa A Da Costa¹; Lucélia S Pereira¹, Ana P Madureira¹, Mário A Duarte¹, Jaderson C Da Costa², Antônio-Carlos G de Almeida¹

1- Laboratory of Experimental and Computational Neuroscience (LaNec), Biomedical Engineering Department, Federal University of São João Del Rei, Brazil.

2- Neuroscience Laboratory, Brain Institute (InsCer); Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil;

Corresponding author:

Prof. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Laboratory of Experimental and Computacional Neuroscience (LaNec)

Biosystems Engineering Department – UFSJ

Pr. Dom Helvécio, 74.

São João del-Rei, MG, Brazil - 36301-160

Tel./Fax: +55 32 33792417

E-mail: acga@ufs.edu.br

Running title: Nonsynaptic mechanisms of Sodium Bromide

Key words: Sodium Bromide, Epilepsy, DIDS, Nonsynaptic Epileptiform Activity, Dentate Gyrus.

Summary

The mechanisms responsible for the anticonvulsant effect of bromide remain unclear. The most acceptable hypothesis is the potentiation of the GABAergic inhibition. This potentiation is dependent on the release of neurotransmitters. However, bromide effectively blocks the nonsynaptic epileptiform activities, where the neurotransmission is absent. In the present study, we investigated the mechanism responsible for NaBr effect on nonsynaptic epileptiform activity. These studies were conducted on hippocampal slices submitted to nonsynaptic epileptiform activity induction by perfusion with zero-added Ca^{++} artificial cerebrospinal fluid (zero- Ca^{++} ACSF). Effects of NaBr, NaCl and chloride channels blockers were registered and analyzed. Bromide application suppressed epileptiform activity. The minimum bromide concentration necessary to full blockage was 9 mM, according to dose-response curve. The hallmark of the blockage is the increase of frequency with a concomitant amplitude reduction. The size of the granular layer involved in the activity decreases progressively with increasing frequency, according to the images of the processed intrinsic optical signal. NaCl increment resulted transient blockage of the activity. Chloride channel blocker resulted in increased frequency with reduction of the size of the granular layer depolarized. The findings allow to infer that the antiepileptic effect of Br^- on the nonsynaptic epileptiform activity may occur through the unique properties of this anion: i) poorly replaces Cl^- on NKCC cotransporters; ii) replaces Cl^- on KCC cotransporters; iii) more permeable than Cl^- on the chloride channels; iv) compete with Cl^- on the chloride channels, reducing Cl^- permeability.

Introduction

Bromides were the first effective treatment for epilepsy. Introduced in 1853 by Sir Charles Locock, bromides remained useful as therapeutic option for nearly 60 years. With the advent of less toxic and more effective treatments, the use of bromides became less usual (Joynt, 1974). However, bromides are still valuable tools in the treatment of epilepsies refractory to current antiepileptic drugs, such as medically refractory tonic-clonic seizures and severe pediatric myoclonic epilepsies (Korinthenberg *et al.*, 2007; Ernst *et al.*, 1988; Steinhoff *et al.*, 1992). Despite its long history and usefulness, the biophysical mechanisms of bromides action remain without a complete elucidation.

The antiepileptic effect of bromide is believed to be due to: i) bromide inhibitory interaction with the enzyme carboanhydrase, resulting in extracellular acidosis and consequent inhibition of epileptiform activity; ii) bromide potentiation of inhibitory postsynaptic potentials by GABA, since Br⁻ ions cross cellular membranes more quickly than Cl⁻, enhancing GABA-activated currents and leading to large hyperpolarization (Woodbury and Pippenger, 1982; Takeuchi and Takeuchi, 1967; Suzuki *et al.*, 1994; Meierkord *et al.* 2000).

The bromide enzyme carboanhydrase inhibition was refuted (Meierkord *et al.* 2000). The experimental findings with hippocampus slices showed that bromide had no effect on the extracellular pH at resting conditions. The pH responses to electrical stimulation were different when NaBr or acetazolamide is present in the perfusate. The acetazolamide is a blocker of the enzyme carboanhydrase and the NaBr effect showed no similarities with the blocker effect. Unlike, the bromide effect increased the salkalotic shift, indicating pro- instead of anticonvulsant effect. Therefore, the bromide anticonvulsant properties may not be attributed to interactions of the anion with the enzyme carboanhydrase.

The second hypothesis had been supported by different experimental approach (Suzuki *et al.*, 1994 and Meierkord *et al.*, 2000). Suzuki *et al.* (1994) showed that bromide potentiates GABA-activated currents in cultured cerebral neurons. Meierkord *et al.* (2000) confirmed these findings with different approach, testing the effect of bromide on GABAergic inhibition in a paired-pulse protocol and on inhibitory postsynaptic currents. The inhibitory GABAergic currents studied depend on the neurotransmission release. However, neurotransmission is absent in

epileptiform activities induced in zero-calcium solution. On the other hand, not only GABA-activated chloride channels are more permeable to bromide, the voltage-dependent chloride channels are also more permeable ($I^- > Br^- > Cl^- > F^-$; 1.98:1.46:1:0.44) (Woodbury and Pippenger, 1982; Franciolini and Nonner, 1987). Since this type of channels is not involved with neurotransmission, bromide effects may be involved with the non-synaptic mechanisms of the epileptiform activity. In fact, Meierkord et al. (2000) observed consistent blockage of NEAs, when hippocampal slices bathed with low- Ca^{++} solution were perfused with NaBr at the concentration of 11 mM. However, any inference can be made from their data in terms of the mechanisms by which bromide blocks nonsynaptic epileptiform activity.

In the present study, we investigated the bromide effects on nonsynaptic epileptiform activities induced in rat hippocampus slices. Our findings would allow to infer that the antiepileptic effect of Br^- on the nonsynaptic epileptiform activity may occur through the unique properties of this anion: i) poorly replaces Cl^- on NKCC cotransporters; ii) replaces Cl^- on KCC cotransporters; iii) more permeable than Cl^- on the chloride channels; iv) compete with Cl^- on the chloride channels, reducing its permeability.

Experimental Procedures

Hippocampal slices preparation and non-synaptic epileptiform activity induction

The experimental protocols were approved by the Ethics Committee of the University Federal of São João del-Rei. Hippocampal slices from male Wistar rats were prepared (4-6 weeks old). After euthanization in a CO_2 chamber, the brains were removed. Transverse slices (400 μm) through the hippocampus were cut with a tissue chopper. The slices were stored in an oxygenated holding chamber for ≥ 1 h before recording. All recordings were acquired in an interface-chamber and continuously perfused with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) at $32^\circ C$ under a stream of humidified 95% $O_2/5\%$ CO_2 . Composition of the ACSF was (in mM): NaCl 127, KCl 2, $MgSO_4$ 1.5, KH_2PO_4 1.1, $NaHCO_3$ 26, $CaCl_2$ 2 and glucose 10. All solutions were bubbled constantly with 95% $O_2/5\%$ CO_2 . Slices were equilibrate for 1h in normal ACSF. Recording electrodes were made of microfilament capillary thin-walled glass (0.9 mm ID, 1.2 mm OD) pulled on a micropipette puller (DMZ Universal

Puller – Zeitz-Instruments). Electrodes were filled with 2 M NaCl and had impedances between 5 and 10 M Ω and connected to a headstage (model AI 402 x 50, ultralow noise amplifier – Axon Instruments, USA). The headstage was connected to a biological amplifier (model Cyberamp 380 – Axon Instruments, USA). The amplified signal was then digitized (sampling frequency of 10 kHz) using a system developed in MatLab platform. Recording electrodes were placed in the cell body layer of the region of interest. Nonsynaptic epileptiform activity was induced in the hippocampus by changing to ACSF containing 0-added calcium and high potassium. The potassium was raised to 8 mM to induce epileptiform activity in the dentate gyrus. The non-synaptic epileptiform activity can take more than an hour to appear, but once it appears, the interval between field bursts and the burst duration remain stable for many hours (Bikson et al., 1999; Pan & Stringer, 1996).

In our laboratory, the interface-chamber is a variant of those used in several studies aimed at analysing with in vitro slices (Pan & Stringer, 1996). The chamber consists of two coupled modules: the perfusion module and the heating module. The slice perfusion module consists of two cylinders and an acrylic base, which attaches superiorly to the heating module. The central cylinder is where a Millipore membrane (0.4 μ m Millicell culture plate inserts; Millipore, Bedford, MA, USA) is inserted. The slices are deposited on the membrane. The region in between the membrane and the acrylic base has approximately 0.34 ml, allowing the solution in contact with the slices, through the membrane, to be constantly renewed. The acrylic base has small holes through which carbogen, after crossing the water bath of the heating module, can humidify and oxygenate the slices. A disc-shaped lid covers the perfusion module ensuring homogeneity of the environment surrounding the slice. The lid has a central hole that allows insertion of the recording electrode and the carbogen release.

Bromide solutions were prepared in four different concentrations (5, 7, 9 and 11 mM of NaBr) added to the zero-added Ca⁺⁺ ACSF by Cl⁻ substitution. The chloride channel blockers SITS solution (4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid - Sigma Chemical, St Louis, MO) and DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid - Sigma Chemical, St Louis, MO) were prepared adding, respectively, 1 mM and 250 μ M to the zero-added Ca⁺⁺ ACSF composition.

Intrinsic optical signal recordings

To monitor regions of the slices where the activities spontaneously emerge and to guide the electrode positioning and also to evaluate the site size of the granular layer that was depolarized, the slices were transilluminated from below using a halogen lamp from the illuminating system of the upright binocular microscope (model SMZ 1500 – Nikon, Japan). The slices were viewed from above through a 3× or 4× objective, depending on the size of the region studied. The video images were captured using a CCD camera (Cool SNAP-Pro cf 1.4 megapixel cooled, USA). The images were processed on-line for composing the images of the light transmittance changes (LTC). For this purpose the frames were digitalized by means of a frame-grabber board (DC10 Plus, Pinnacle, USA), controlled by an acquisition software developed in MatLab platform. All images were captured at a rate of 30 frames per second. Optionally, the images can be processed offline. In this case, all captured frames were stored on a DVD disc. The electrographic signal was used to control the range of the frames to be captured.

To obtain the LTC images, the calculation was carried out similarly to the method described by Andrew et al. (1996) and Holtkamp et al. (2003). Briefly, the averages of the corresponding pixels of the first 50 frames, before the epileptiform event, formed the control image (T_{cont}), which was subtracted, pixel by pixel, from each subsequent experimental image (T_{exp}). The resultant image of this subtraction was divided, pixel by pixel, by the T_{cont} . Specifically

$$LTC = \frac{(T_{exp} - T_{cont})}{T_{cont}} \quad (1)$$

Using a false color scale, the LTC images revealed areas of the slice where the light transmittance changes with time. To condense on a single image the spatiotemporal features (STF) of the paroxysmal activity, the contour of the layer involved in the activity is resembled by a polygonal, drawn manually, by setting pixel positions that are then linked forming the polygonal (Figure 1.A).

The STF images were built column by column. For each LTC image, the average intensity of the pixels of a square region (21×21 pixels) centered in each pixel of the polygonal was calculated. These values corresponds to the intensities of each pixel of the column obtained rectifying the polygonal over a vertical line. The

STF image is composed disposing these columns, from left to right, following the temporal sequence (Figure 1.B and 1.C).

Quantitative analysis – extracellular potential

The parameters extracted from the extracellular potential were: DC shift (DC); event duration (ED); maximum amplitude of population PS (PS); interval between events (IE). The Digital Fourier Transform was used to quantify the DC-shift. Once in the frequency domain, the signal corresponding to the event to be analyzed was recalculated considering only the components inferior to 10 Hz. This process allows reconstructing the event without population spikes. From this signal, the DC could be determined avoiding subjective criteria for determining the parameter. On the other side, with the signal reconstruction considering only the components superior to 10 Hz, the maximum PS was also measured. The instant of time where the negative deflection reaches 20% of the DC was considered the initial time and the instant of time where the negative deflection returns to 20% of the DC was considered the final time. ED was calculated by subtracting the final time from the initial time of an event. IE was calculated subtracting the initial time of an event and the final time from the preceding event. In Figure 2 is depicted a schematic representation of the parameters quantified for analysis of the bursts characteristics changes. These parameters were based on the study conducted by Roper et al. (1993).

Statistical Analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to test whether the distribution of sampling errors have normal distribution. When this was observed the t test was used, otherwise a nonparametric test, Mann-Whitney test, was performed to compare each pair of treatment. The level of significance throughout the study was $P < 0.05$.

Results

Effect of sodium bromide on nonsynaptic epileptiform activity

Electrographically, the non-synaptic epileptiform activity, recorded in the extracellular space of the granular layer of the dentate gyrus, is characterized by ictogenic period with intense population spikes bursts with amplitudes around 10 mV, duration between 30 – 60s and inter-event interval around 50s (Fig. 3). These bursts

are always accompanied by a negative DC-shift (5-10 mV). Concurrently to the electrographic manifestations, the optical images show that the site of the epileptiform activities are restricted to the DG area and, the granular layer involved in the activity never cover the entire layer.

Bath application of NaBr is rapidly equilibrated in the tissue as can be monitored by the baseline shift promoted by the change of the junction potential of the micropipette electrode when Cl^- is changed by Br^- . In our perfusion system, the complete exchange of the perfusate demands approximately 2.5 min.

Typical features of field potentials and IOS image before, during and after NaBr application are shown in figure 3, for different NaBr concentrations (5, 7, 9 and 11 mM, $n=6$ for each concentration).

When bromide was applied, field potentials morphology changed showing an increase in the events frequency, and a decrease of their duration, with posterior disappearance of the amplitudes. At all concentrations tested and also in all corresponding trials the increasing frequency was typical. However, the blockage was effective only with 9 and 11 mM. At 5 mM, no blockage was observed. At 7 mM, the blockage was observed in 4 trials.

The STF image (figure 3B) corresponds to 9 mM of NaBr. The site size of the depolarized granular layer decreases progressively following the extracellular potential. The correspondent period of time to the simultaneous suppression of field potentials and IOS was assumed as the blockage duration (BD). BD depends on NaBr concentration, as shown in figure 3A, and was chosen as the parameter to evaluate the bromide dose-response (figure 3C). A sigmoidal function was adjusted (gradient method) as the representative function for the BD dose-response. The fitted curve indicates that for a full NEA blockage it is necessary at least ~9 mM of NaBr.

The reversibility of the bromide effects were evaluated comparing the parameters DC, IE, ED and PS before and after the NaBr application to each concentration studied. Each parameter corresponds to the average of 6 events after NaBr application normalized in respect to the average of 6 events before the NaBr application. The parameters were calculated for each concentration tested (5, 7, 9 and 11 mM). The Control group refers to registers where no NaBr was applied. For each parameter, the NaBr groups were compared with the Control. The DC parameter showed no significant difference for all NaBr concentrations. PS and IE showed significant difference only at 11 mM and DE at 7, 9 and 11 mM.

Effect of sodium chloride increment on nonsynaptic epileptiform activity

To test the effect of the extracellular Cl^- increment on the nonsynaptic epileptiform activity, 7 trials were performed. Incrementing the NaCl concentration resulted after 10 ± 5 min in the prolongation of the interictal state to 1.51 ± 0.12 (normalized with the average of the IE of the 6 events preceding the NaCl increment). At the end of the perfusion, the nonsynaptic epileptiform activity had tendency to return to the interictal state duration previous to the perfusion, as can be seen by the curve adjusted to the data (Figure 5B). No significant changes were observed for the parameters DC, ED and PS.

Effect of chloride channels blockers on nonsynaptic epileptiform activity

Since it is very well established that chloride channels play an important role in the effect bromide on synaptic epileptiform activity, it is useful to investigate how blockers of this channels act on NEAs. CLC-2, one of the members of the chloride channel family is significantly expressed in the brain and can be activated by hyperpolarization and extracellular acidification (Jentsch et al., 2002). DIDS, a chloride channel blocker, acts on CLC-2 and other types of chloride channels (Jentsch et al., 2002) and was used to test its effect. DIDS experiments were performed similar to those with NaBr. It took ~ 15 min for DIDS to have effect. Extracellular potential also exhibit the frequency increase (14.64 ± 4.35 -fold), however, without blockage. The effect of DIDS on the site size of the granular layer that was depolarized was the reduction in 0.4 ± 0.2 -fold. These effects are not reversible since the blockers bind irreversibly to channels (Jentsch et al, 2002). A typical effect of DIDS is shown in figure 6.

Discussion

The mechanisms responsible for the NaBr anticonvulsant effects are still unknown. NaBr is also effective to block of the nonsynaptic epileptiform activity. The nonsynaptic epileptiform activity is particularly pronounced in dentate gyrus. The current experiments were designed to identify the mechanisms of NaBr action on nonsynaptic epileptiform activity induced in the dentate gyrus.

The duration of the blockage (BD) along 20 min of perfusion shows that NaBr concentration-dependently blocked the discharges (Figure 3 b). The blockage is effective in the 7 to 11 mM concentrations ranging. This dependence on the concentration was also observed in nonsynaptic activity induced in hippocampus CA1 region (Meierkord et al 2000). These authors also observed that in CA1 the NaBr reduces the frequency or blocks the discharges. However, in dentate gyrus, we observed that the frequency increases and only after this event the blockage takes place (Figure 3 a). In all experiments conducted in the present work this increase in the frequency of the events preceding the blockage was the hallmark of the NaBr effect.

The quantification of the parameters related to nonsynaptic epileptiform events before and after the NaBr blockage (Figure 4) shows that the basic characteristic of the events, in terms of amplitude and time dynamics, are not dramatically affected by the NaBr. This reversibility of the NaBr effect indicates that in the range of 7 to 9 mM NaBr is easily washed and do not affect permanently the neuronal tissue activity.

Two mechanisms of action of bromide are being proposed: the inhibition of carbonic anhydrase (Woodburry and Pippenger, 1982) and the potentiation of the GABA-activated currents (Suzuki et al., 1994). The first hypothesis was not supported by the experiments conducted by Meierkord et al. (2000), where the NaBr did not changed the pH baseline and enhanced the alkalotic shift stimulus induced, which would be rather pro- than anticonvulsant. Meierkord e al. (2000) also addressed experiments to test the second hypothesis. The GABA-ergic potentiation observed by Suzuki et al. (1994) was measured by means of paired-pulse protocol and patch-clamp recordings from cultured hippocampal neurons. However, in the present study, the absence of Ca^{++} in the bath solution induced the GABA-ergic receptors inactivation. Therefore, other mechanism must be responsible for the blockage.

It can be expected that the observed potentiation of the bromide inhibitory action of the GABA-ergic receptors can also take place for the not neurotransmission dependent chloride channels. This principle guided the design of the experiments performed in the present work.

Suzuki et al. (1994) estimated that the relative permeability ratio of GABA_A coupled channels to Br⁻ with respect to Cl⁻ is 1.51. According to the authors, this higher relative permeability would be responsible for the increased in the GABA_A

activated outward currents elicited by the application of bromide. It was estimated that the therapeutic concentration of Br^- (20 mM) corresponds to a 1.30-fold enhancement of the outward currents (holding potential 0 mV), enough to hyperpolarize the membrane potential. However, under the circumstances of the nonsynaptic epileptiform activity induction, the solely effect on the permeability seems not to be enough for the blockage. This can be deduced from the mathematical model of Almeida et. (2008). According to the model and simulations, the crucial effect of raising extracellular K^+ , for inducing the nonsynaptic epileptiform activity, is the concomitant reduction of the Cl^- Nernst potential. This reduction is promoted by the interplay action of NKCC and KCC cotransporters. The former is responsible for the Cl^- influx, and the last one for its extrusion. In the situation of the nonsynaptic epileptiform activity induction, the simulations show that the NKCC influx of Cl^- , relative to its KCC efflux, is more effective and the net effect is a intracellular Cl^- accumulation. This accumulation is responsible for the Cl^- Nernst potential overcoming the membrane potential. The Cl^- efflux is then able to induce the progressive neuronal depolarization, constituting the basic characteristic of the interictal state. Taking this dynamic in to account, we can infer that the solely effect of Br^- on the membrane potential, by means of its higher permeability in respect to Cl^- inducing hyperpolarization, would be the prolongation of the interictal state. However, this is not in agreement with our experimental findings on the DG field, where the hallmark of the NaBr effect was the frequency increase followed by the blockage.

To confirm that the hyperpolarization reinforcement by Br^- would only be responsible for the prolongation of the interictal state, we tested the effect of the increment of the extracellular Cl^- concentration in 15 mM (Figure 5). In the experiment of 11 mM Cl^- substitution by Br^- , considering the presumed chloride channel permeability increase of 1.51, the corresponding Cl^- increment would be of 5.5 mM. Therefore, smaller effect would be expected than the observed with 15 mM of Cl^- . With addition of 15 mM of NaCl, a transient prolongation of the interictal state was in fact observed. Additionally, at the end of the perfusion, the nonsynaptic epileptiform activity had tendency to return to the interictal state duration previous to the perfusion. What can be inferred from this finding is that the chloride permeation through the membrane, by means of channels, cotransporters and other processes, promotes an ionic equilibration between intra and extracellular space, reducing the chloride gradient and also its effect. To sustain the blockage effect, Br^- must not

accumulate in the intracellular space. Therefore, it can be supposed that Br^- may not replace Cl^- on NKCC cotransporter and, on the other hand, may replace on KCC cotransporter. In fact, these are in accordance with reports showing Br^- poorly replacing Cl^- on NKCC and partially on KCC (Payne et al., 2007; Geck et al., 1980).

Working with the hypothesis that there must be a more complex Br^- effect on the chloride channels, specifically the Cl^- and Br^- competition, we tested the effect of a partial blockage of the channels with chloride channels blockers (SITS and DIDS) during the nonsynaptic epileptiform activity (Figure 6). These blockers were used in a half-maximal concentration for the blockage. The observed frequency increase is in accordance with the same frequency increase preceding the nonsynaptic epileptiform blockage with NaBr. This observation suggests that the frequency increase can be due to Br^- competitive effect on the chloride channels, reducing the Cl^- permeability.

Working with the hypothesis that there must be a more complex Br^- effect on the chloride channels, specifically the Cl^- and Br^- competition, we tested the effect of a partial blockage of the channels with chloride channels blocker (DIDS) during the nonsynaptic epileptiform activity (Figure 6). These blockers were used in a half-maximal concentration for the blockage. The observed frequency increase is in accordance with the same frequency enhancing of frequency noted in the nonsynaptic epileptiform blockage with NaBr. This observation suggests that the frequency increase can be due to Br^- competitive effect on the chloride channels, reducing the Cl^- permeability.

Conclusions

The results of this study allow to infer that the antiepileptic effect of Br^- on the nonsynaptic epileptiform activity may occur through the unique properties of this anion: i) poorly replaces Cl^- on NKCC cotransporters, ii) replaces Cl^- on KCC cotransporters; iii) more permeable than Cl^- on the chloride channels; iv) compete with Cl^- on the chloride channels, reducing its permeability. The Br^- interaction with the cotransporters avoids its accumulation in the intracellular space, sustaining its transmembrane gradient, favourable to the hyperpolarization action on the membrane potential. The chloride channel more permeable to Br^- enhances its action. This action is even potentiated when the Br^- competition with Cl^- reduces the channel permeability to this ion. When the Cl^- intracellular accumulation is the main

responsible the increased excitability, situation typical of several conditions that sustain seizures, the depression of the Cl^- effect is remarkably effective.

Acknowledgements

The study was supported by grants from CAPES CNPq and FAPEMIG. F.N. Carlesso and M.A Duarte were recipient of a scholarship from CAPES – PROCAD # 008055.

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

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

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

References

Almeida A-C G, Rodrigues AM, Duarte MA, Silveira GA, Scorza FA, Arida RM, Da Costa J, Cavalheiro EA (2011) Biophysical Aspects of the Nonsynaptic Epileptiform Activity. In: *Epilepsy / Book 6.* (Kaneez FS ed.) Intech OAP. In press

Almeida A-C G, Rodrigues AM, Scorza FA, Cavalheiro EA, Teixeira HZ, Duarte MA, Silveira GA, Arruda EZ (2008) Mechanistic hypotheses for non-synaptic epileptiform activity induction and its transition from the interictal to ictal state – Computational simulation. *Epilepsia* 49: 1908-1924.

Andrew RD, Adams JR, Polischuk TM (1996) Imaging NMDA- and kainate-induced intrinsic optical signals from the hippocampal slice. *J Neurophysiol* 76:2707-17.

.Bikson M, Ghai RS, Baraban SC, Durand DM (1999) Modulation of burst frequency, duration, and amplitude in the zero- Ca^{2+} model of epileptiform activity. *J Neurophysiol* 82:2262-2270.

Ernst JP, Dooze H, Baier WK.(1988) Bromides were effective in intractable epilepsy with generalized tonic-clonic seizures and onset in early childhood. *Brain Dev* 10:385-8.

Franciolini F, Nonner W. (1987) Anion and cation permeability of a chloride channel in rat hippocampal neurons. *J Gen Physiol* 90:453-78.

Geck P, Pietrzyk C, Burckhardt BC, Pfeiffer B, Heinz E. (1980) Electrically silent cotransport on Na^+ , K^+ and Cl^- in Ehrlich cells. *Biochim. Biophys. Acta* 600: 432–447.

Holtkamp, M, Buchheim, K, Siegmund, H, Meierkord, H (2003) Optical Imaging Reduced Seizure Spread and propagation Velocities in Aged Rat in vitro. *Neurobiology of aging* 24: 345-53.

Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82:503-68.

Joynt RJ (1974) The use of bromides for epilepsy. *Am J Dis Child* 128:362-3.

Korinthenberg R, Burkart P, Woelfle C, Moenting JS, Ernst JP (2007) Pharmacology, efficacy, and tolerability of potassium bromide in childhood epilepsy. *J Child Neurol* 22:414-8.

Meierkord H, Grunig F, Gutschmidt U, Gutierrez R, Pfeiffer M, Draguhn A, Bruckner C, Heinemann U (2000) Sodium bromide: effects on different patterns of epileptiform activity, extracellular pH changes and GABAergic inhibition. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361:25-32.

Pan E, Stringer JL (1996) Burst characteristics of dentate gyrus granule cells: evidence for endogenous and nonsynaptic properties. *J Neurophysiol* 75:124-32.

Payne JA , Rivera C, Voipio J, Kaila K (2007) Cation–chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *TRENDS in Neurosciences* 26:199-206.

Steinhoff BJ, Kruse R (1992) Bromide treatment of pharmaco-resistant epilepsies with generalized tonic-clonic seizures: a clinical study. *Brain Dev* 14:144-9.

Suzuki S, Kawakami K, Nakamura F, Nishimura S, Yagi K, Seino M (1994) Bromide, in the therapeutic concentration, enhances GABA-activated currents in cultured neurons of rat cerebral cortex. *Epilepsy Res* 19:89-97.

Takeuchi A and Takeuchi N (1967) Anion permeability of the inhibitory post-synaptic membrane of the crayfish neuromuscular junction. *J Physiol* 191:575-90.

Woodbury DM, Pippenger CE (1982) Bromides. In: *Antiepileptic drugs* (Woodbury DM, Penry JK, Pippenger CE, ed). pp797-801 New York: Raven.

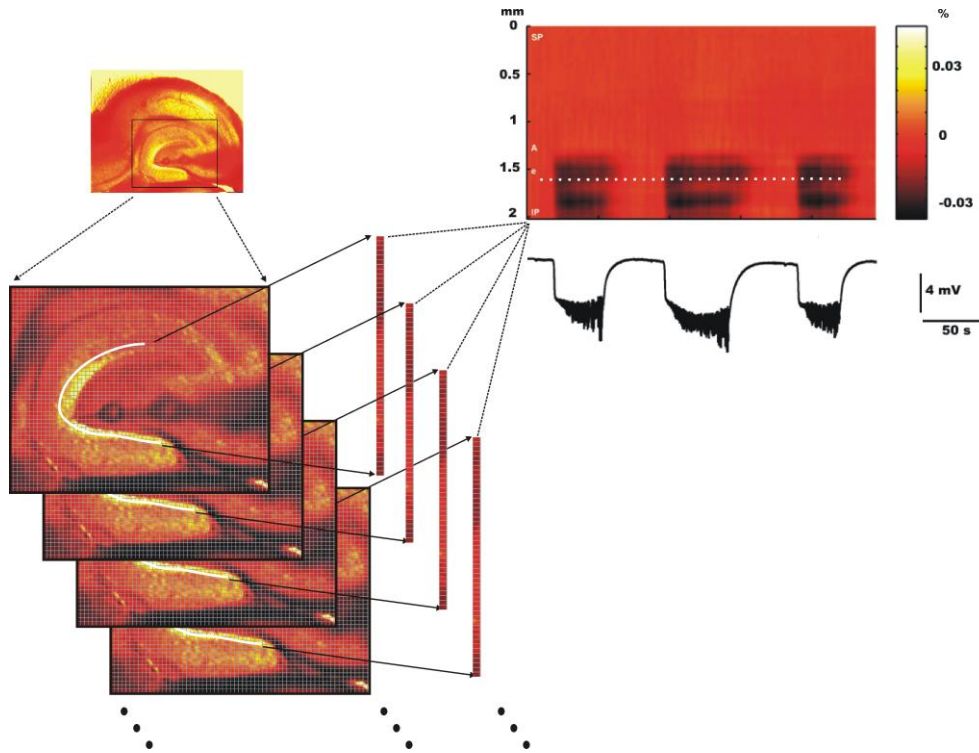


Figure 1. Schematic representation of the procedure for composing the STF images. (A) Hippocampus slice demarking the DG region. (B) The polygonal representing the contour of the granular layer of each frame is formed by the pixels representing the light transmittance changes. For each frame is represented the corresponding rectified polygonal. (C) Disposing each rectified polygonal side by side, from left to right, the STF images are composed. (below) Extracellular potential registered simultaneously. The color scale indicates the percentage of the light transmittance change. Extracted from Almeida et al. (2011).

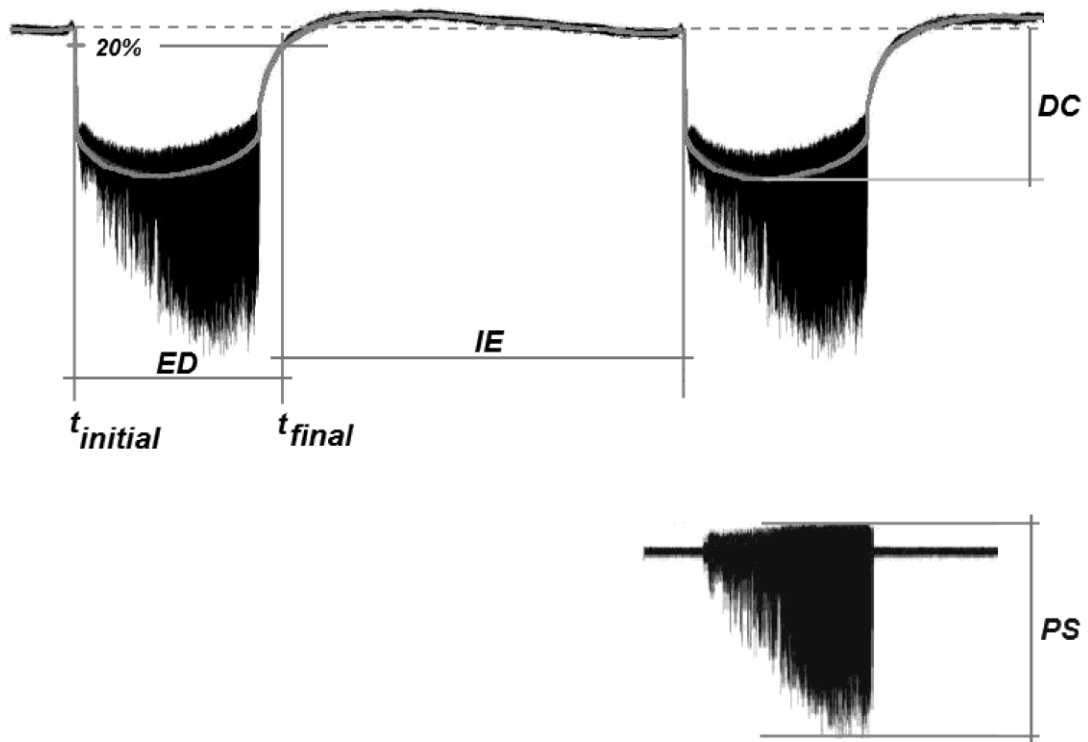


Figure 2. Schematic representation of the parameters quantified for analysis of the bursts characteristics. $t_{initial}$ = initial time (instant of time where the negative deflection reaches 20% of the DC); t_{final} = final time (instant of time where the negative deflection returns to 20% of the DC); latency (LT), DC shift (DC); event duration (ED); maximum amplitude of population PS (PS); event duration (ED); interval between events (IE).

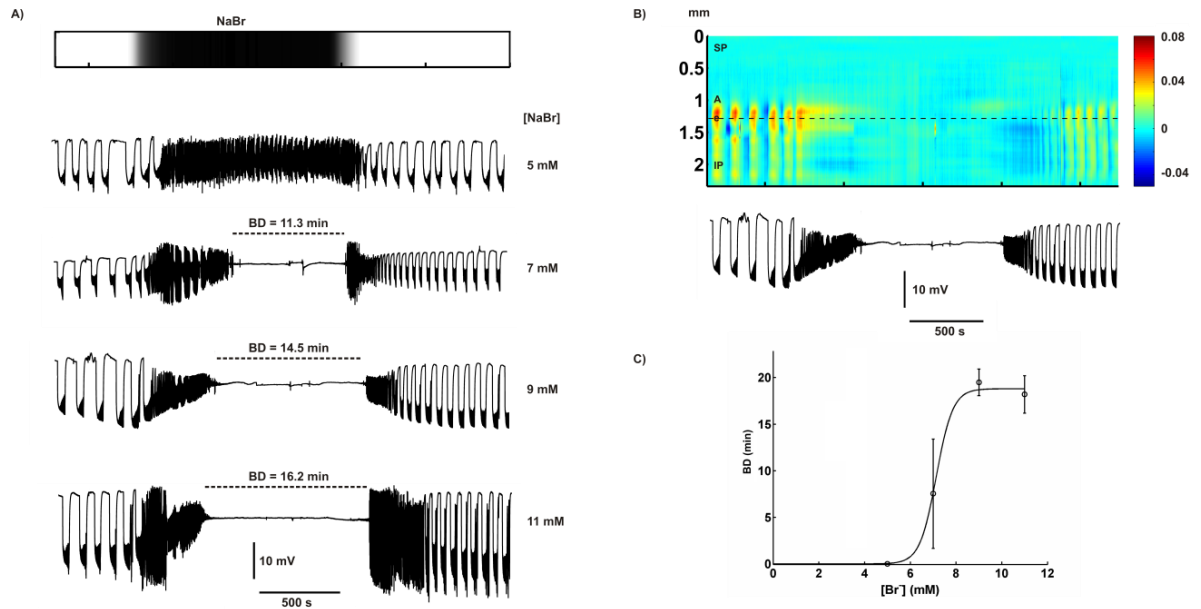


Figure 3. (A) Effects of NaBr on nonsynaptic epileptiform activity at different concentrations. On top, the black region corresponds to the interval of NaBr application. The corresponding blockage duration (BD) of each typical extracellular potential are depicted. (B) Spatio temporal feature image (STF) of the epileptiform activity and NaBr blockage. The false color scale indicates the percentage of the light transmittance change. (C) Bromide dose-response. (SP = suprapyramidal, A = apex, IF = infrapyramidal)

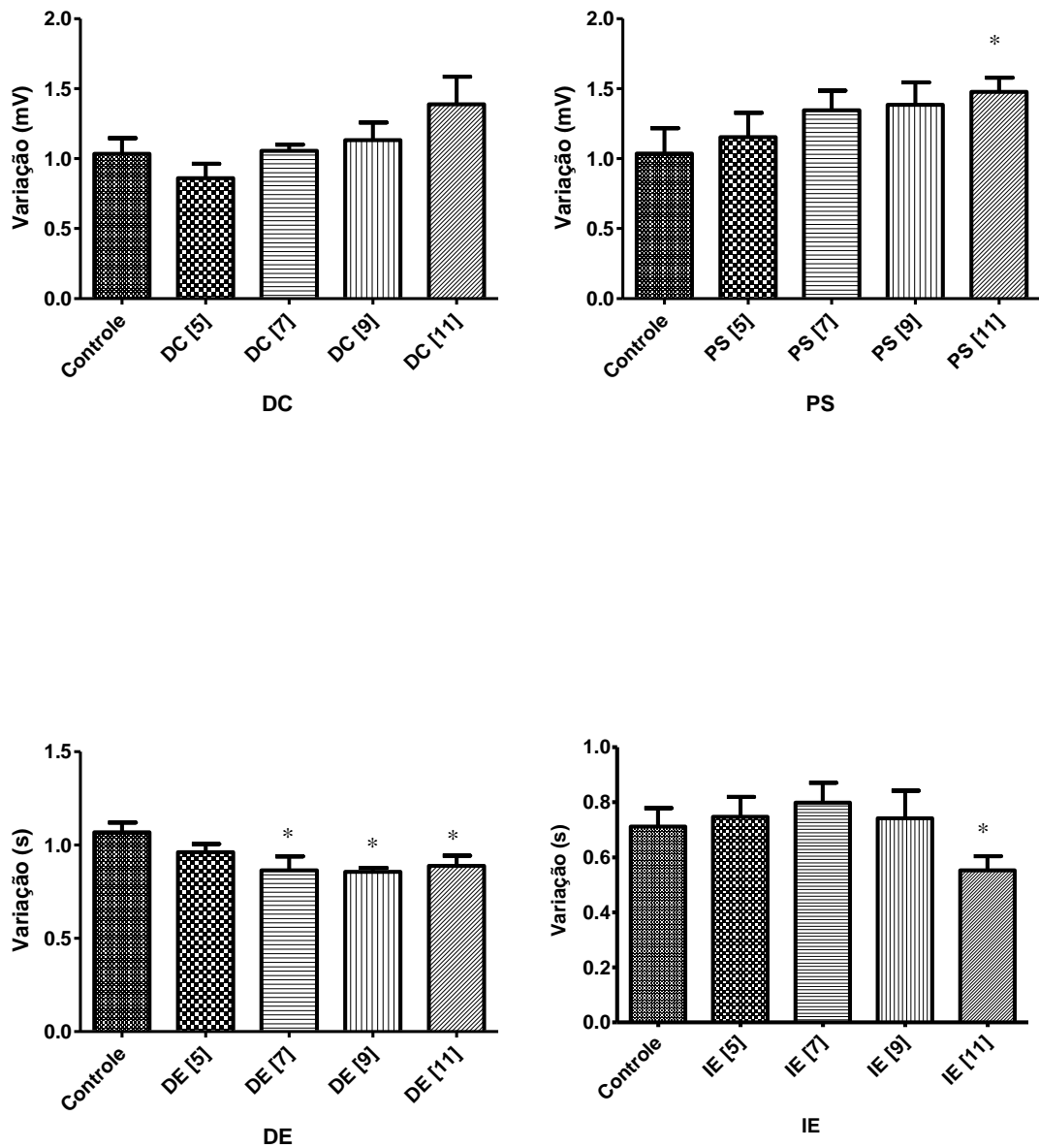


Figure 4 – NaBr effect after the washout. The parameters DC, PS, DE and IE, average of 6 events after NaBr application, were normalized in respect to the average of 6 events before the NaBr application, at each concentration (5, 7, 9 and 11 mM). The Control group refers to registers where no NaBr was applied. Asterisks indicates significant difference between the NaBr group and Control. Mann-Whitney test was performed to compare each pair. The level of significance was $P < 0.05$.

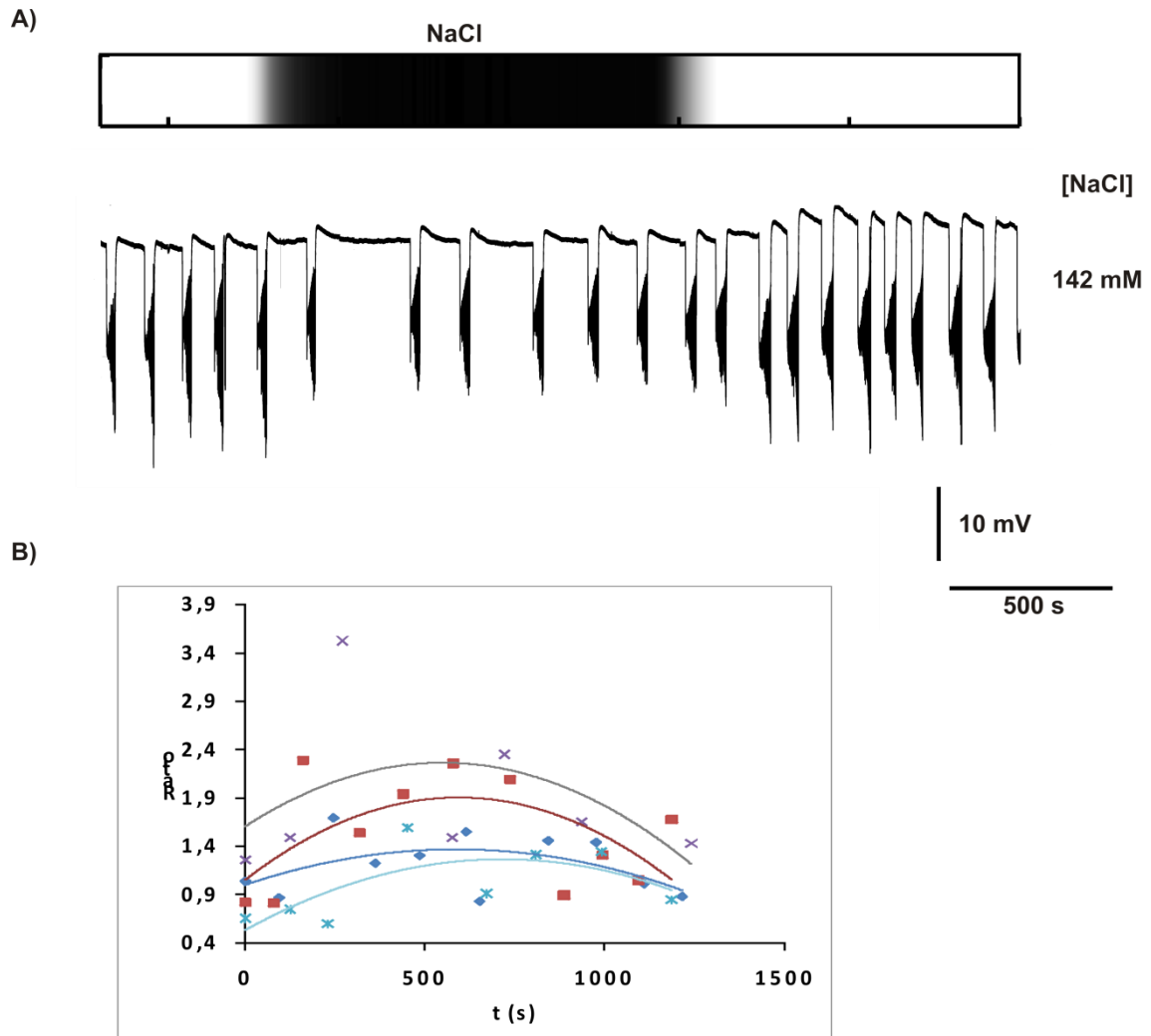


Figure 5 - Effect of NaCl on nonsynaptic epileptiform activity. (A) Typical extracellular potential. During NaCl application, frequency decreases transiently. (B) During NaCl application, the IE parameters (normalized in respect to the average of the 6 events previous to the NaCl increment) were plotted in function of the instant of the event occurrence. All curves ($n=6$) were plotted in the same graphics allowing to observe the tendency.

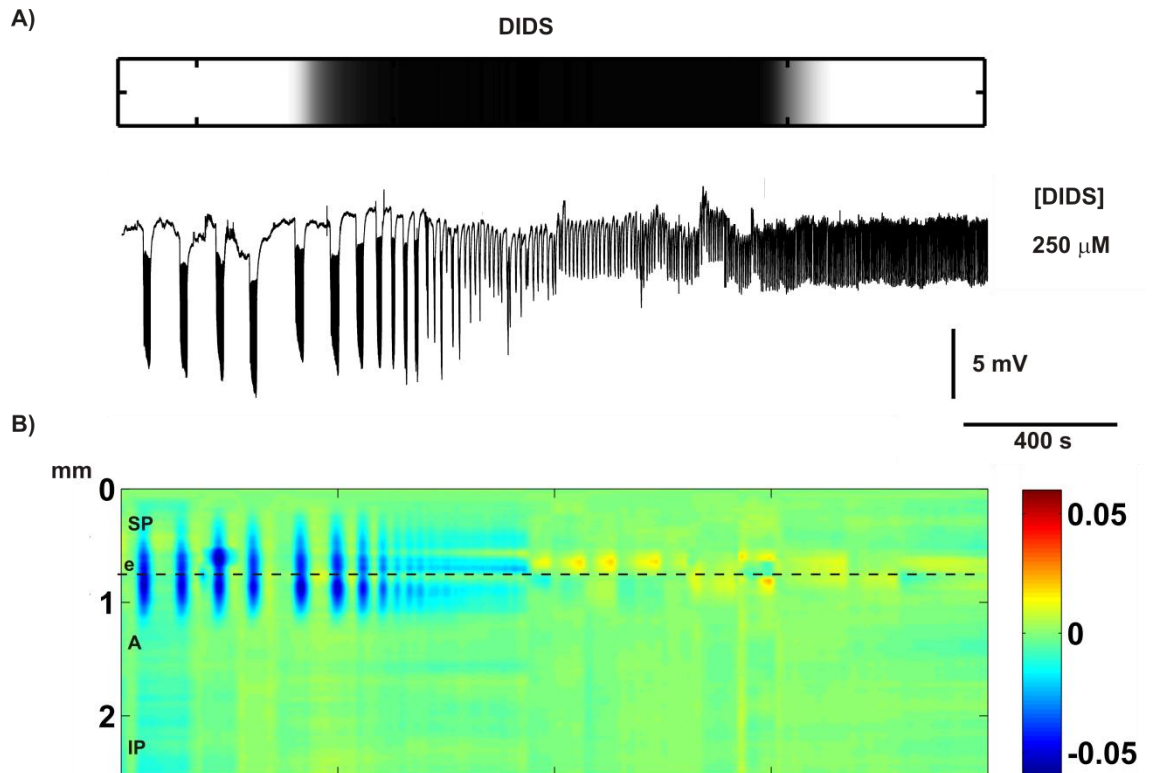


Figure 6. (A) Effect of chloride channels blocker on nonsynaptic epileptiform activity. On top, the black region corresponds to the interval of DIDS application. Simultaneously, (B) the spatio temporal feature image (STF) of the effect. The false color scale indicates the percentage of the light transmittance change. (SP = suprapyramidal, A = apex, IF = infrapyramidal)

ANEXO B – Combined Effect Of Bumetanide, Bromide And Gabaergic Agonists - An Alternative Treatment For Intractable Seizures

Artigo aceito pela revista: *Epilepsy & Behavior*, 20: 148–150, 2011.

Combined effect of bumetanide, bromide and GABAergic agonists - an alternative treatment for intractable seizures

Antônio-Carlos G. Almeida^{a*}; Fulvio A. Scorza^b; Antônio M. Rodrigues^a; Ricardo M. Arida^c; Fernanda C. Noal^d; Aline G. Batista^b; Mario A. Duarte^a; Jaderson C. Costa^d.

^a *Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional / Programa Institucional de Bioengenharia / Universidade Federal de São João del-Rei*

^b *Departamento de Neurologia Experimental / Escola Paulista de Medicina/ Universidade Federal de São Paulo*

^c *Departamento de Fisiologia / Escola Paulista de Medicina / Universidade Federal de São Paulo*

^d *Instituto do Cérebro / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul*

*corresponding author.

Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional, Programa Institucional de Bioengenharia, UFSJ, Pr. Dom Helvécio, 74, São João del-Rei – MG, CEP: 36301-170, Brazil. FAX:+ 55 32 3379 2417
E-mail: acga@ufs.edu.br

Combined effect of bumetanide, bromide and GABAergic agonists - an alternative treatment for intractable seizures

The epilepsies are one of the most common serious brain disorders that know no geographic, social, or racial boundaries, occurring in men and women and affecting people of all ages, though more frequently affecting young people in the first two decades of life and people over the age of 60 (7, 8). Worldwide, there are at least 50 million people who have epilepsy and many of these cases are refractory to treatment with the currently available therapies (7, 9, 10). The most common risk factors for epilepsy are cerebrovascular diseases, brain tumours, alcohol, traumatic head injuries, genetic inheritance, and malformations of cortical development (11, 12). In resource-poor countries, endemic infections, such as malaria and neurocysticercosis seem to be major risk factors (13).

The paradoxical excitatory action of GABA observed in the immature brain plays a role in neonatal development (14, 15), but also is responsible for their increased seizure propensity and lowered seizure threshold (16). Differently from mature neurons of adults, the immature neurons of neonates exhibit a much higher $[Cl^-]$; induced by the higher $Na^+K^+2Cl^-$ co-transporter type 1 (NKCC1) expression and lower K^+Cl^- type 2 (KCC2) expression. Under this circumstance the activation of $GABA_A$ receptors is followed by an efflux of Cl^- , induced by the positivity of Nernst potential for Cl^- in respect to the membrane potential, which accounts for the excitatory action of GABA.

Almost all neurological insult (hypoxia-ischemia, metabolic derangement, hemorrhage, and infection) sustained during the neonatal period can trigger the synchronous firing of hyperexcitable neurons that underlie epileptogenesis (17). Investigations conducted in human epileptogenic tissue had shown that dysplastic tissue may retain immature properties, exhibiting mechanisms of seizure generation resembling that observed during development in the immature brain (18, 19).

To unravel the mechanisms involved in seizure-initiation, epileptogenesis, spontaneous recurrent seizures and to search for a new treatment options, several experimental models mimicking different aspects of the epileptic process have been developed. Along of the seizures induction process, which leads to spontaneous seizures, many studies conducted with experimental models, had identified the activation of an inflammatory state (20). Concomitantly with the inflammation

expression changes of NKCC1 and KCC2 co-transporters have been observed that resemble the immature brain (21). An increasing number of investigations suggest an important role for cation-chloride co-transporters in controlling neuronal functions (12). Deregulation of their expression may contribute to the mechanisms of hyperexcitability, which, in combination with neuronal coupling, may lead to synchronization and, therefore, to seizures. The hyperexcitability is mainly attributed to the chloride accumulation in the intracellular space (21) and the hypersynchronism to the non-synaptic coupling promoted by the extracellular space volume decrease (22, 23).

The neurophysical studies of the molecular mechanisms that underlie the hyperexcitation and synchronization of neurons has a profitable role in the search for targets for novel anti-convulsants strategies to control seizures that mainly affect infants. The treatment of refractory seizures, normally associated to intracellular chloride accumulation, involves complex interaction of the mechanisms responsible for controlling the intracellular chloride level. Multiple combined drugs, each one targeting different mechanisms, must be a promising powerful strategy to be investigated. It can be conjectured a more efficient action coupled with less side effects, since each compound would be used in low doses, presuming their synergistic effect on the system.

The initial attention about cation-chloride co-transporters (CCCs) first focused on their physiological roles in the recovery of cell volume after swelling or shrinkage in hypotonic or hypertonic media (24). Later, was identified the CCCs importance on regulation of intracellular Cl^- in the central nervous system (CNS) (25). In mature brain, the normal level of intracellular chloride must be low enough to establish inhibitory GABAergic neurotransmission. This condition is due to minimal NKCC1 expression but robust KCC2 expression.

The chloride accumulation, typical in immature brain, as well as in some adult epilepsy syndromes, is promoted by the equilibrium established by the resulting changes in the expression of NKCC1 and KCC2. The findings about the mechanisms involved show that the co-transporters activities, driven by gradients established by the Na/K pumps function (26), have the net effect of controlling the intracellular chloride level. Studies conducted by our research group, based on computational simulation, have also shown the importance of the interplay between these mechanisms to determine the excitability level (22). The KCC co-transporter is

responsible for the Cl^- extrusion, counteracted by Cl^- influx, promoted by NKCC co-transporters. The simulations reproduce the Cl^- accumulation corresponding to an extracellular K^+ increase, typical in situations of intense neuronal firing.

Animals with epilepsy induced by pilocarpine exhibit gaba reverse potential, E_{GABA} , positively shifted in granule cells (21, 27). This shift in E_{GABA} alters synaptic integration, increasing granule cells excitability and results in compromised “gate” function of the dentate gyrus.

Investigations have been carried out on the use of co-transporters inhibitors, such as furosemide and bumetanide, as antiepileptic agents (27, 28) . The studies, conducted in hippocampal slices, suggest the blockage of the NKCC as critical to the anti-epileptic effects of chloride-transport antagonism (29). This fact was also confirmed by computational simulation (22). According to these simulations, the Cl^- accumulation in the intracellular space during the ictal state was mediated by the NKCC co-transporter, which happened with almost the same flux along of the ictal state. The Cl^- efflux was dominated by the KCC co-transporter and during the ictal state it was always smaller than the Cl^- NKCC influx. Only at the transition between the ictal/interictal states, the KCC efflux overcame the NKCC influx and was responsible for the intracellular Cl^- concentration decrease. These findings show NKCC as an important target for antiepileptic drugs and bumetanide has been highlighted for its adequacy. Bumetanide has an approximately 500-fold greater affinity for NKCC1 (K_i of $\sim 0.1\mu\text{M}$) than for KCC2 (K_i of $\sim 25\text{-}50\mu\text{M}$), differently furosemide inhibits NKCC1 and KCC2 with equal potency (K_i of $\sim 25\text{-}50\mu\text{M}$). Therefore, at low doses (2-10 μM) bumetanide is relatively specific inhibitor of NKCC1 (30).

Bromides were the first effective treatment for epilepsy. Introduced in 1853 by Sir Charles Locock, bromides remained useful as therapeutic option for nearly 60 years. With the advent of less toxic and more effective treatments, the use of bromides became less usual (31). However, bromides are still a valuable tool in the treatment of refractory epilepsies to current antiepileptic drugs, such as medically refractory tonic-clonic seizures and severe pediatric myoclonic epilepsies (32-34), the pharmacological activity of bromides remains without a complete elucidation.

The most acceptable hypothesis for explaining bromide mechanisms for epileptic activity blockage is the increase of neuronal hyperpolarization, mediated by inhibitory postsynaptic potentials (35). The antiepileptic effect of bromide is believed

to be due to the potentiation of inhibitory postsynaptic potentials by GABA, since Br⁻ ions cross cellular membranes more quickly than Cl⁻, enhancing GABA-activated currents and leading to large hyperpolarization (36). But not only GABA-activated chloride channels are more permeable to bromide, the voltage-dependent are also more permeable (I > Br > Cl > F; 1.98:1.46:1:0.44) (37). This fact justifies why bromide also has effects on non-synaptic epileptiform activity (NEA). Meierkord et al. (38) observed consistent blockage of NEAs, when hippocampal slices bathed with low-Ca⁺⁺ solution were perfused with NaBr at the concentration of 11 mM. If bromide would also substitute for chloride in the CCCs, no objection would be considered on the assumption that bromide would also accumulate intracellularly. Since this is not the case, the antiepileptic mechanism of bromide may not only be through bromide reinforcement of the Cl⁻ hyperpolarizing Nernst potential, but may also be due to bromide having low affinity with the NKCC enzyme in comparison with Cl⁻ (39, 40). In synthesis, these considerations support the mechanism of bromide antiepileptic effect may be divided in three main actions: i) compensation of Cl⁻ accumulation by means of its hyperpolarizing effect through the chloride channels; ii) its antagonistic effect on the chloride through the channels, due to its supposed competition with chloride; iii) the low NKCC enzyme affinity to bromide .

We propose a combined therapeutic use of bumetanide and bromide aiming at the seizure incidence reduction. The administration of bumetanide would reduce the intracellular chloride concentration and bromide would reinforce the E_{GABA} negativity, according to figure 1, where the systemic effects of bumetanide and bromide are depicted. Although acting according to different mechanisms, both effects reduce the neuronal excitability. Once the effects are complementary, the doses of bumetanide and bromide to be used could be reduced and, consequently, their side effects as well. In fact, in recent case report about the use of bumetanide for autism treatment, the authors did not observed, at the dosage investigated, any side effect [31]. To overcome the bromide severe side effects described in the clinic field [32], it is indispensable to administer it with the care and follow-up testing with periodic monitoring of serum bromide should be an inviolable rule. We also propose that effort should be directed to find anions or anionic compounds able to replace bromide with the aim to avoid its side effects. These proposals open up new perspectives on the use of bromide, i.e., valuing its clinical efficacy associated with a reduction of its side effects. Furthermore, we also hypothesize that clinical observation of seizure

reduction would also be indicative of the E_{GABA} negativity (figure 1). Under such clinical conditions, after bumetanide and bromide effects had already established, shifting GABA from excitation to inhibition, the administration of GABA agonists should be considered in the treatment of uncontrollable seizures. With the action of these agonists, it is assumed that the doses of bumetanide and bromide could be reduced further.

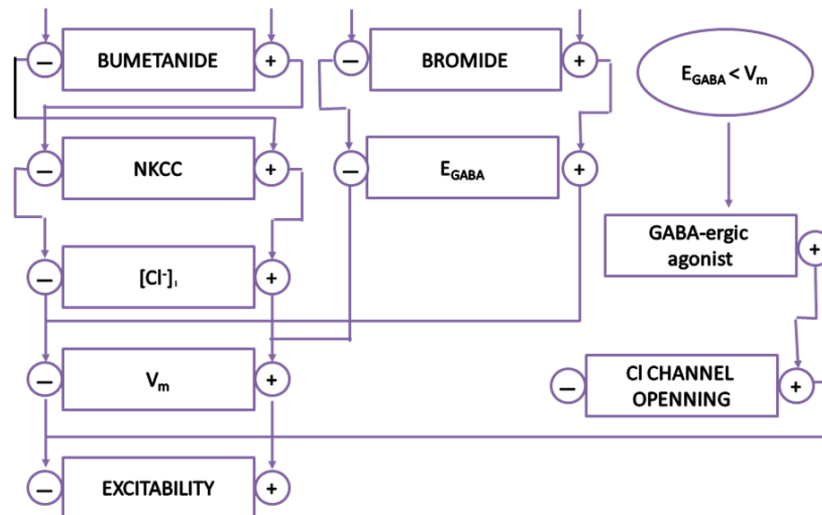


FIGURE 1 – Block diagram indicating the systemic action of the conjoint effect of bumetanide, bromide and GABA_A agonist. Bromide acts by blocking the NKCC activity. This co-transporter is responsible for the Cl⁻ influx, which induces the accumulation of this ion in the intracellular space, inducing excitability increase. An NKCC antagonist is, therefore, able to counteract the chloride accumulation decreasing excitability. Bromide acts directly on E_{GABA} improving its negativity and also decreasing excitability. The conjoint effect of an NKCC antagonist and bromide are therefore complementary. The clinical observation of seizure reduction could be indicative of an induced E_{GABA} negativity in respect to V_m (intracellular potential), when the use of GABA-ergic drugs can be useful. – NKCC = Na, K, 2Cl⁻ co-transporter; E_{GABA} = GABA reverse potential;

Acknowledgments

This work was supported by PROCAD/CAPES, CNPq and FAPEMIG

References

- [1] Sander J. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol* 2003;16: 165-70.
- [2] de Boer H, Mula M, Sander J. The global burden and stigma of epilepsy. *Epilepsy Behav* 2008;12: 540-6.
- [3] Sander J. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia* 1993;34:1007-16.
- [4] Kwan P, Sander J. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75: 1376-81.
- [5] Halatchev V. Epidemiology of epilepsy--recent achievements and future. *Folia Med (Plovdiv)* 2000;42: 17-22.
- [6] Aronica E, Boer K, Redeker S, Spliet W, van Rijen P, Troost D, Gorter J. Differential expression patterns of chloride transporters, Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter and K⁺-Cl⁻ cotransporter, in epilepsy-associated malformations of cortical development. *Neuroscience* 2007;145: 185-96.
- [7] Duncan J, Sander J, Sisodiya S, Walker M. Adult epilepsy. *Lancet* 2006;367: 1087-100.
- [8] Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 2002;3: 728-39.
- [9] Owens D, Kriegstein A. Developmental neurotransmitters? *Neuron* 2002;36: 989-91.
- [10] Staley K. Wrong-way chloride transport: is it a treatable cause of some intractable seizures? *Epilepsy Curr* 2006;6: 124-7.
- [11] Kahle K, Staley K. Altered neuronal chloride homeostasis and excitatory GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Curr* 2008;8: 51-3.
- [12] Avoli M, Louvel J, Pumain R, Köhling R. Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Prog Neurobiol* 2005;77: 166-200.
- [13] Cepeda C, André V, Levine M, Salamon N, Miyata H, Vinters H, Mathern G. Epileptogenesis in pediatric cortical dysplasia: the dysmature cerebral developmental hypothesis. *Epilepsy Behav* 2006;9: 219-35.

- [14] Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 2005;46: 1724-43.
- [15] Pathak H, Weissinger F, Terunuma M, Carlson G, Hsu F, Moss S, Coulter D. Disrupted dentate granule cell chloride regulation enhances synaptic excitability during development of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 2007;27: 14012-22.
- [16] de Almeida A, Rodrigues A, Scorza F, Cavalheiro E, Teixeira H, Duarte M, Silveira G, Arruda E. Mechanistic hypotheses for nonsynaptic epileptiform activity induction and its transition from the interictal to ictal state--computational simulation. *Epilepsia* 2008;49: 1908-24.
- [17] Santos D, Rodrigues A, de Almeida A, Dickman R. Firing patterns and synchronization in nonsynaptic epileptiform activity: the effect of gap junctions modulated by potassium accumulation. *Phys Biol* 2009;6: 046019.
- [18] Hoffmann E, Dunham P. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int Rev Cytol* 1995;161: 173-262.
- [19] Kaila K. Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1994;42: 489-537.
- [20] Schwartzkroin P, Baraban S, Hochman D. Osmolarity, ionic flux, and changes in brain excitability. *Epilepsy Res* 1998;32: 275-85.
- [21] Hochman D, Schwartzkroin P. Chloride-cotransport blockade desynchronizes neuronal discharge in the "epileptic" hippocampal slice. *J Neurophysiol* 2000;83: 406-17.
- [22] Payne J, Rivera C, Voipio J, Kaila K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 2003;26: 199-206.
- [23] Joynt R. The use of bromides for epilepsy. *Am J Dis Child* 1974;128: 362-3.
- [24] Korinthenberg R, Burkart P, Woelfle C, Moenting J, Ernst J. Pharmacology, efficacy, and tolerability of potassium bromide in childhood epilepsy. *J Child Neurol* 2007;22: 414-8.
- [25] Ernst J, Doose H, Baier W. Bromides were effective in intractable epilepsy with generalized tonic-clonic seizures and onset in early childhood. *Brain Dev* 1988;10: 385-8.
- [26] Steinhoff B. Antiepileptic therapy with bromides--historical and actual importance. *J Hist Neurosci* 1992;1: 119-23.
- [27] Woody R. Bromide therapy for pediatric seizure disorder intractable to other antiepileptic drugs. *J Child Neurol* 1990;5: 65-7.
- [28] Suzuki S, Kawakami K, Nakamura F, Nishimura S, Yagi K, Seino M. Bromide, in the therapeutic concentration, enhances GABA-activated currents in cultured neurons of rat cerebral cortex. *Epilepsy Res* 1994;19: 89-97.

[29] Franciolini F, Nonner W. Anion and cation permeability of a chloride channel in rat hippocampal neurons. *J Gen Physiol* 1987;90: 453-78.

[30] Meierkord H, Grünig F, Gutschmidt U, Gutierrez R, Pfeiffer M, Draguhn A, Brückner C, Heinemann U. Sodium bromide: effects on different patterns of epileptiform activity, extracellular pH changes and GABAergic inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;361: 25-32.

[31] Lemmonier E, Ben-Ari Y. The diuretic bumetanide decreases autistic behaviour in 5 infants treated during 3 months with no side effects. *Acta Paediatrica* 2010; 99(12):1885-1888.

[32] Friedlander W. The rise and fall of bromide therapy in epilepsy. *Arch Neurol* 2000;1782:5.