

O ÁLCOOL POTENCIALIZA OS EVENTOS PAROXÍSTICOS NÃO SINÁPTICOS ATRAVÉS DE COTRANSPORTADORES DE CLORETO

L. E. C. Santos*; G. A. Silveira*; A. M. Rodrigues*; V. D. C. Costa*; A. P. Madureira*; F. A. Scorza**; K. A. Ferreira*; S.C.B. Silva*; A.G. Batista***; M.A.Duarte*; A. C. G. Almeida*

* Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional, UFSJ, São João Del-Rei, MG, Brasil.

** Disciplina de Neurologia Experimental, Escola Paulista de Medicina, Unifesp, São Paulo, SP, Brasil

***Faculdade Santa Rita (FaSaR), Conselheiro Lafaiete, MG, Brasil

e-mail: luizcanton@yahoo.com.br

Resumo: O presente trabalho relata a influência dos cotransportadores de cloreto, NKCC1 e KCC2, nos processos epiléticos sustentados por mecanismos não sinápticos, em ratos submetidos a alcoolização prolongada. Ratos Wistar machos adultos administrados com etanol, durante 3 meses, foram analisados a partir de indução de atividades epileptiformes não sinápticas (AENS), por meio do modelo de zero cálcio e alto potássio, além de avaliação histológica, utilizando fatias de hipocampo. Os dados sugerem que o consumo de etanol promove mudanças nos mecanismos não sinápticos que modulam os eventos paroxísticos. O uso de bumetanida (BUM), bloqueador específico de NKCC1, durante a indução das AENS, suprimiu a potenciação observada e provocou diminuição consistente em todos os parâmetros analisados. Os achados indicam que o cotransportador NKCC1 desempenha papel central na modulação das AENS e seu bloqueio pode ser uma estratégia promissora para reduzir os danos pela intoxicação e abstinência alcoólicas.

Palavras-chave: Eletrofisiologia, alcoolismo, NKCC1, Atividades não sinápticas, bumetanida

Abstract: This paper reports the influence of the chloride cotransporters, NKCC1 and KCC2, on epileptic processes not supported by synaptic mechanisms, investigated in rats subjected to prolonged ethanol consumption. Adult male Wistar rats administered with ethanol for 3 months were analyzed during induction of nonsynaptic epileptiform activity (NSEA) in hippocampal slices by means of the zero-calcium and high potassium model. In addition, histological evaluation was performed. The data suggest that alcohol consumption may induce changes in non-synaptic mechanisms that modulate the paroxysms. The use of bumetanide (BUM), specific blocker of NKCC1, during the AENS induction, suppressed the potentiation observed and caused consistent reduction in all parameters analyzed. The findings suggest that the NKCC1 cotransporter plays a pivotal role in modulating AENS and its blockade may be a promis-

ing strategy to reduce damages promoted by alcohol intoxication and abstinence.

Keywords: Electrophysiology, alcoholism, NKCC1, Nonsynaptic activities, bumetanide

Introdução

A ingestão crônica de álcool promove alterações fisiológicas e patológicas no cérebro [1,2]. Existem relatos clínicos mostrando que alcoolistas, frequentemente, possuem histórico de convulsões, tanto durante a intoxicação, como nos períodos de abstinência do álcool [2]. Em modelos animais, foi relatado o impacto do consumo de etanol, a longo prazo, sobre AENS [3]. As investigações sobre esses mecanismos têm ganhado atenção desde que foram observadas atividades sincronizadas mesmo após o bloqueio da ação sináptica em fatias hipocámpais [4]. Evidências apontam os mecanismos não sinápticos, tais como os cotransportadores de cátion-cloreto, como alvos para o controle das atividades epileptiformes [5]. Mudanças na expressão de cotransportadores de cátion-cloreto e de células gliais do hipocampo têm sido observadas pelo uso crônico de etanol, acompanhadas de aumento hídrico celular, gênese de eventos paroxísticos, inchaço cerebral e neuroinflamação [3]. Processos de edema celular e hipersincronismo neuronal podem ser evitados pela administração de diuréticos, o que sugere o envolvimento dos cotransportadores NKCC1 e KCC2 nas alterações da osmolaridade do tecido nervoso provocadas pelo álcool [3,5]. Essas informações em conjunto, sugerem uma forte ligação entre alcoolismo e crises epiléticas mediadas por mecanismos não sinápticos. Curiosamente, a potencialização das AENS ocorreram para a doses mais baixas de etanol e demonstrou-se que esse efeito foi devido à ação dos cotransportadores NKCC1.

Materiais e métodos

O presente trabalho obedeceu as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSJ, conforme protocolo 03/2011.

Alcoolização dos animais - Ratos Wistar machos, com seis semanas de idade, foram aleatoriamente divididos em quatro grupos, contendo 14 animais cada: controle, Etanol 1 (E1), Etanol 2 (E2) e Etanol 3 (E3). A partir da sexta semana de vida, os grupos Etanol receberam uma dose diária de 1,0g/kg, 2,0g/kg e 3,0g/kg, respectivamente, de uma solução de 30% v/v de etanol, por gavagem, durante três meses. Para o grupo controle, na mesma dosagem e período, foi administrada solução salina. Ao término do período de alcoolização, os animais dos grupos Etanol foram levados para indução das AENS, 2 horas após a última dose de etanol ingerida.

Eletrofisiologia (n=5 por grupo) - Após eutanização, os hipocampus foram isolados dos encéfalos. sob gotejamento com solução de Ringer gelada, e seccionados em fatias de 400 μ m de espessura. As secções permaneceram imersas em solução Ringer normal, em uma câmara de perfusão, por, aproximadamente, 40 minutos, a 31° C. Em seguida, as fatias foram transferidas para uma câmara de interface, para indução das AENS, por meio de perfusão com solução de Ringer com alta concentração de potássio e zero-cálcio adicionado. O potencial extracelular (PE) foi registrado a partir do posicionamento de um eletrodo de registro na região do GD de cada fatia experimental. O eletrodo de registro foi constituído de fio de prata cloretado, inserido em micropipeta de vidro preenchida com solução de NaCl 2,0 M (impedância de 5 a 10 M Ω). O eletrodo foi diretamente conectado a um pré-amplificador (modelo AI 402 x 50, ULTRALOW NOISE AMPLIFIER – AXON INSTRUMENTS) interligado a um amplificador (modelo CYBERAMP 380 – AXON INSTRUMENTS) para uma amplificação final de 500 vezes. Por meio de uma interface analógico-digital, os sinais do PE, pré-filtrados com filtro passa-baixa de 1 kHz, foram digitalizados a uma frequência de amostragem de 3 kHz. A fim de testar os efeitos do bloqueio do NKCC1, o diurético bumetanida (12,5 μ M diluída em 500 μ L de DMSO adquiridos a partir de Sigma, St. Louis, MO) foi adicionado à solução de indução, após 20 minutos do início dos eventos das AENS.

Para análise quantitativa do PE das AENS foram analisados parâmetros tais como: amplitude da componente DC (DC), amplitude dos population spikes (PS's), duração dos eventos (DE), intervalo entre eventos (IE) e latência (LT). As quantificações foram realizadas por meio de um sistema computacional desenvolvido em plataforma MATLAB, versão 7.1.

Histologia por Imunofluorescência (n=5 por grupo) - Após os procedimentos de alcoolização, os animais foram anestesiados, utilizando-se ketamina (100mg/kg) e xilazina (5mg/kg), e imediatamente submetidos a perfusão transcardíaca com solução salina e paraformaldeído (1%). A seguir, os encéfalos foram removidos e mantidos em solução de paraformaldeído (1%) *overnight* e seccionados a 40 μ m de espessura

(vibrátomo - Leica VT 1000S). Para a marcação fluorescente as fatias foram duplamente marcadas com T4 Anti-NKCC1 (1:500, DSHB, Iowa) e Anti-KCC2 (1:500 Abcam). Após incubação com anticorpos primários, as fatias receberam ambos os anticorpos secundários CY2 (Jackson ImmunoResearch 1:200), e CY3 (Jackson ImmunoResearch 1:200) por 2 horas. Em seguida, foram lavadas em PBS e montadas em lâminas, com a adição posterior de glicerol para a montagem das lâminas. As amostras foram mantidas em freezer -20 °C até a análise por microscopia confocal (LSM-710 - Zeiss). Foram utilizadas 3 secções por animal.

Densitometria óptica - As imunomarcações foram quantificadas utilizando-se a técnica de densitometria óptica [3]. Esta técnica consiste em converter as imagens capturadas para escala de cinza e traçar os seus respectivos histogramas. As marcações do tecido a serem quantificadas correspondem, na imagem, às regiões com pixels apresentando maiores intensidades. Assim, um limiar inferior para a intensidade de cada pixel foi estabelecido como critério para quantificação das marcações. A expressão de cada mecanismos foi adotada como sendo o número de pixels com intensidade maior ou igual ao limiar adotado dividido pela quantidade total de pixels da imagem. O sistema de quantificação foi desenvolvido em MATLAB, com imagens de alta resolução e sob mesma ampliação óptica. Os valores foram representados como percentagem correspondente à marcação da imagem da secção.

Análise estatística dos dados - Foi realizado, para cada uma das variáveis testadas, o teste de D'Agostino/Pearson para verificação da normalidade dos erros amostrais. Demonstrada a normalidade dos dados, foi utilizado para comparação múltipla das médias o teste post-hoc de Dunnett, após a análise de variância de um critério. O nível de significância de probabilidade de erro adotado foi de 5%.

Resultados

Os mecanismos não sinápticos das atividades epileptiformes são alterados pelo álcool por meio da funcionalidade dos cotransportadores.

Os registros eletrofisiológicos das AENS mostraram diferenças significativas entre os grupos alcoolizados com características que se relacionam à concentração de álcool utilizada. Verificou-se a ocorrência de uma potenciação para o parâmetro DC, quando os animais são alcoolizados na dosagem de 1g/kg, todavia na concentração de 3g/kg, ocorre uma depressão do DC. O parâmetro PS mostrou diferenças significativas nos grupos de maior concentração (E2 e E3), em relação aos demais grupos. Os valores de DE mostraram uma diminuição significativa em todos os grupos alcoolizados em relação a seus controles, sendo que essa diminuição foi ainda mais intensa nos registros dos grupos E3. No IE, observou-se uma redução significativa para os três grupos alcoolizados, quando comparados ao controle. A LT para início das AENS aumentou significativamente para os grupos E2 e E3.

Os valores do PE, após à perfusão com BUM, se mostraram com diminuição em todos os grupos alcoolizados, em relação ao período anterior à perfusão. O grupo controle não apresentou diferenças estatísticas após a perfusão com BUM. Os parâmetros quantificados dos registros foram comparados com os períodos anteriores à ação da BUM para identificação das alterações eletrográficas. A síntese da quantificação dos parâmetros que caracterizam os grafos elementos do potencial extracelular para os grupos estudados, além das comparações estatísticas, entre os grupos, antes e após a perfusão com BUM, é apresentada na Figura I. Observa-se a supressão da potenciação do DC para o grupo alcoolizado com a menor dosagem.

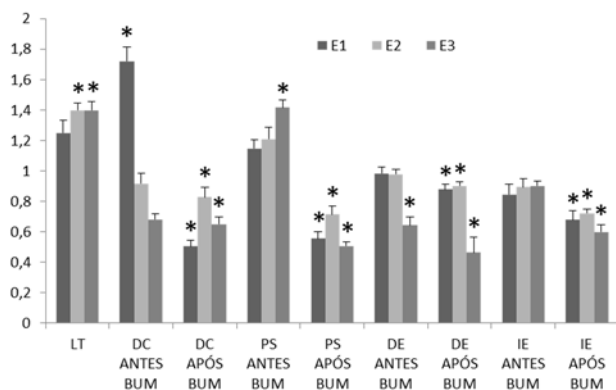


Figura 1 - Análise comparativa dos parâmetros quantificados para o potencial extracelular da AENS dos grupos submetidos à alcoolização por 3 meses. Os dados dos gráficos para os valores ANTES BUM foram normalizados em relação ao controle. Os valores para os parâmetros analisados APÓS BUM foram normalizados em relação aos valores de seus respectivos grupos ANTES BUM. Todos os valores são apresentados como média \pm EPM normalizados. Barras de erro indicam o EPM. *p < 0,05.

O uso de álcool promove alterações não sinápticas na expressão de cotransportadores.

Sinais imunorreativos de NKCC1 para o anticorpo T4 revelaram a presença da enzima no corpo celular de células granulares e em processos dendríticos da camada molecular do GD. Uma maior expressão da enzima NKCC1 foi verificada em animais de todos os grupos alcoolizados. Destacou-se a alcoolização com 3g/kg que apresentou uma expressão de NKCC1 ainda mais intensa, como visto na Figura II - A.

As imunomarcações para KCC2 exibiram uma nítida marcação perissomática em células granulares do GD de todos os animais analisados. Imagens típicas das marcações para KCC2 no GD de animais dos grupos estudados são apresentadas na Figura II - A. Nesta imagem, são também apresentadas as análises comparativas das quantificações por densitometria óptica (Figura II - B e C). Considerando-se toda a extensão do GD, os animais alcoolizados apresentaram aumento significativo da expressão de KCC2 em todos os grupos tratados com álcool por 3 meses.

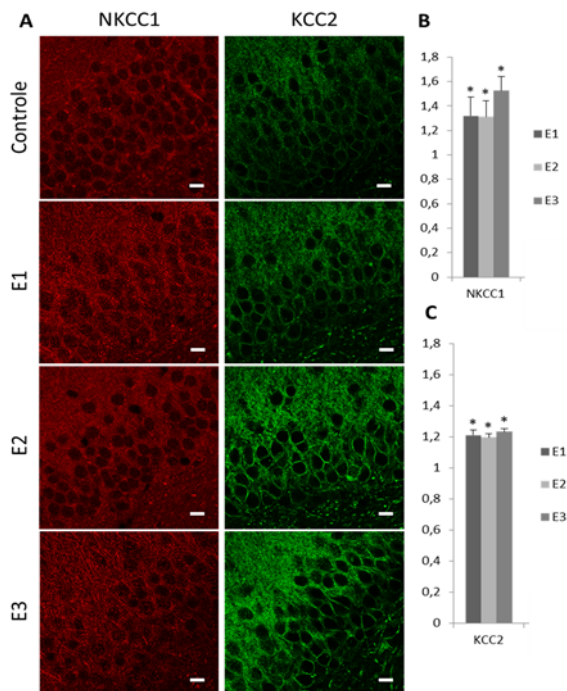


Figura 2 - Imagens representativas das imunomarcações em microscopia confocal para NKCC1 (vermelho) e KCC2 (verde). As imagens demonstram a mudanças provocadas pelo álcool. Houve super-expressão de NKCC1 em todos os grupos. Em KCC2, observa-se marcação perissomática mais intensa, além de um aumento da intensidade também na camada molecular do GD. As barras brancas (10 μ m) indicam a escala. Os dados dos gráficos são apresentados normalizados em relação ao controle, como média \pm EPM. Barras de erro indicam o EPM. *p < 0,05.

Discussão

As principais alterações observadas com a alcoolização a longo prazo são: i) A predisposição à hiperexcitabilidade e ao hiper-sincronismo mediados pela alcoolização com a menor concentração de etanol. ii) As alterações na expressão dos cotransportadores de cloreto em dependência do uso de álcool; iii). O incremento de NKCC1 está associado às alterações eletrográficas observadas.

Para três meses de intoxicação por álcool observa-se o mesmo comportamento de potenciação para a dosagem de 1 g/kg, já descrito para o tratamento por 1 mês, no que se refere à componente DC [3]. Para dosagens mais altas (2 e 3 g/kg), a alcoolização parece continuar afetando os fluxos iônicos, como observado pela redução da componente DC. Essa observação encontra apoio em verificações de ocorrência de degeneração contínua pelo uso prolongado de álcool [6].

A sobre-regulação de NKCC1 também foi observada nos animais alcoolizados por 1 mês [3]. De acordo com Khirug e colaboradores [7], o aumento desses cotransportadores, principalmente no cone de implantação axonal, provoca intenso recrutamento neuronal e, conseqüentemente, leva ao sincronismo entre células granulares hipocámpais. Esse hiper-sincronismo está evidenciado pelo aumento da amplitude dos PS's. Além disso,

a alta expressão de NKCC1 deve aumentar a taxa de acúmulo de cloreto intracelular, favorecendo a excitabilidade neuronal e diminuindo os períodos interictais (IE).

A neurodegeneração, afeta diretamente a matriz extracelular [8] que, por conseguinte, altera os fluxos extracelulares. Com menor atuação funcional dos neurônios, provocada pelo processo neurodegenerativo, e o aumento da regulação de K^+ extracelular por astrócitos reativos [3,6], pode-se esperar a diminuição da duração dos períodos ictais, como mostra o parâmetro DE.

O acúmulo de cloreto provocado pelo aumento do NKCC1 pode ser diminuído pelo aumento do KCC2. Esse fato pode ser responsável pela diminuição no tempo para acúmulo efetivo de cloreto intracelular, dificultando o início para a indução de crises, como observado no parâmetro LT.

Vários estudos têm relatado inchaço em células hipocâmpais, provocado pelo álcool, e isso parece ser devido pelo aumento dos fluxos de íons provocados pela elevada expressão do NKCC1, o que acaba promovendo afluência simultânea de cátions, ânions ou ambos [3]. Um aumento do inchaço associado à $[Cl^-]_i$ fornece uma força motriz favorável para extrusão líquida de Cl^- e K^+ pelo KCC2, o que ajudaria na recuperação do inchaço. Esse aspecto poderia explicar o aumento da expressão de KCC2, como um mecanismo compensatório para evitar o acúmulo de cloreto interno [9]. Porém, em condições de alto $[K^+]_o$, como o utilizado para indução de AENS, pode ocorrer uma inversão na funcionalidade do KCC2 [9]. Nesse contexto, o KCC2 provocaria ainda maior acumulação do cloreto interno, e, conseqüentemente, levaria o tecido a um sincronismo significativamente maior, como o observado via parâmetro PS, no grupo E3. O incremento observado no parâmetro PS também podem estar relacionados a inversão da funcionalidade de KCC2. Reforçando essa hipótese, vários trabalhos evidenciam a diminuição de mecanismos excitatórios e de insulto por edema celular, com a utilização da furosemida, um diurético bloqueador de NKCC1 e KCC2 [10].

Conclusão

Os resultados discutidos nesse trabalho destacam a complexa interação entre os cotransportadores NKCC1 e KCC2 nas alterações dos mecanismos não sinápticos, induzidas pelo consumo de álcool a longo prazo. Conclui-se que o co-transportador NKCC1 desempenha um papel central na modulação das atividades epileptiformes não sinápticas e seu bloqueio pode ser uma estratégia promissora para reduzir os danos induzidos pelo álcool no cérebro. Assim, propõem-se que tais mecanismos não sinápticos merecem atenção e devem ser investigados como potenciais alvos de intervenção farmacológica, que precisam ser considerados no design de novas drogas, para o tratamento de alcoolistas.

Agradecimentos

CAPES, FAPEMIG e CNPq.

Referências

- [1] Zuccoli N, Siddiqui N, Cravo I, Bailey I, Gallucci M, Harper CG, Neuroimaging findings in alcohol-related encephalopathies. *Am. J. Roentgenol.* 2010; 195:378–384.
- [2] Bartolomei F, Epilepsy and alcohol. *Epileptic Disorders.* 2006; 8:72–78.
- [3] Santos LEC, Silveira GA, Costa VDC, Batista AG, Madureira AP, Rodrigues AM, Scorza CA, Amorim HA, Arida RM, Duarte MA, Scorza FA, Cavaleiro EA, Almeida ACG. Alcohol Abuse Promotes Changes in Non-Synaptic Epileptiform Activity with Concomitant Expression Changes in Cotransporters and Glial Cells. *PLoS One.* 2013; 8:1–10.
- [4] Taylor CP, Dudek FE. Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science.* 1982; 218:810–812.
- [5] Löscher W, Puskarjov M, Kaila K, Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology.* 2013; 69:62–74.
- [6] Brandão F, Paula-Barbosa MM, Cadete-Leite A. Piracetam impedes hippocampal neuronal loss during withdrawal after chronic alcohol intake. *Alcohol.* 1995; 12:279–88.
- [7] 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; 28:4635–4639.
- [8] Wright JW, Masino AJ, Reichert JR, Turner GD, Meighan SE, Meighan PC, Harding JW. Ethanol-induced impairment of spatial memory and brain matrix metalloproteinases. *Brain Res.* 2003; 963:252–61.
- [9] Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci.* 2003; 26:199–206.
- [10] M. A. Collins, J. Y. Zou, E. J. Neafsey, Brain damage due to episodic alcohol exposure in vivo and in vitro: furosemide neuroprotection implicates edema-based mechanism. *FASEB J.* 1998; 12, 221–230.