

ALTERAÇÕES DE pH DURANTE A INDUÇÃO DE ATIVIDADES EPILEPTIFORMES NÃO-SINÁPTICAS

A. M. Rodrigues*, F. A. S. Oliveira *, M. A. Duarte*, and A. C. G. de Almeida*

* Departamento de Engenharia de Biosistemas / UFSJ, São João del Rei – MG, Brasil

email: amr@ufs.br

Resumo: Tem sido proposto que a acidificação dependente da atividade neuronal, a qual ocorre durante o período ictal, age como um mecanismo intrínseco de regulação para término de crises epileptiformes. O objetivo do presente trabalho foi investigar, por meio de simulações computacionais, quais mecanismos são essenciais para descrever as alterações do pH extra- e intracelular e qual o efeito dessas alterações durante as crises epileptiformes não-sinápticas (AENS). O modelo matemático utilizado descreve a camada granular do giro dentado do hipocampo de rato. Nesse modelo, a movimentação iônica extracelular é representada por uma equação de eletrodifusão. São descritos transportes iônicos transmembrânicos (canais iônicos, bomba de Na/K, cotransportadores e trocadores iônicos), alterações dos volumes celulares e acoplamentos não-sinápticos. Para descrever o comportamento do pH, foram incluídos os trocadores Na^+/H^+ (NHE) e $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (HCE), a bomba de H^+ e o efeito da enzima anidrase carbônica. As simulações sugerem que a acidificação intracelular neuronal é causada pela atividade do NHE e que a acidificação simultânea extracelular é causada pelo influxo de HCO_3^- por meio do trocador HCE. A acidificação extracelular durante o evento reduz as permeabilidades iônicas da membrana neuronal diminuindo a excitabilidade.

Palavras-Chave: epilepsia, pH, modelo matemático.

Abstract: *It has been proposed that the acidification caused by neuronal activity, which occurs during the ictal period, acts as an intrinsic regulatory mechanism for termination of epileptiform seizures. The objective of this study was to investigate, by means of computational simulations, mechanisms related to the regulation of the intra- and extracellular pH and their effects during non-synaptic epileptiform seizures. The mathematical model describes the granular layer of the dentate gyrus of rat hippocampus. The extracellular ion movement is represented by an electrodiffusion equation. Transmembrane ion transport (ion channels, Na / K pump, cotransporters and exchangers), changes in cell volume and non-synaptic couplings are described. To describe the pH behavior, Na^+/H^+ (NHE) and $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (HCE) exchangers, the pump of H^+ and the effect of the carbonic anhydrase enzyme were included. Simulations suggest that neuronal intracellular acidification is caused by the NHE activity, and the simultaneous extracellular acidification is caused by the influx of HCO_3^- through the HCE. The extracellular acidification during the ictal period reduces the ionic permeability*

reducing excitability and facilitates the pump Na / K effect of ending the discharge.

Keywords: epilepsy, pH, mathematical model.

Introdução

Crises epilépticas neonatais são frequentemente não tratáveis com drogas anti-epilépticas, tais como fenobarbital [1], as quais aumentam a ação inibitória mediada por receptores GABAA em adultos [2]. Portanto, a procura por novas drogas anti-epilépticas e outras estratégias terapêuticas é particularmente importante para crises em neonatos. A manipulação do pH pode ser um caminho útil para controlar atividades epileptiformes em neonatos e cérebros jovens [3].

Embora os resultados da literatura apontem um mecanismo de ação do pH sobre as atividades epileptiformes, os mecanismos que determinam o comportamento do pH durante as atividades epileptiformes ainda não estão bem esclarecidos [3]. XIONG et al. [4,5] observaram que durante o período ictal de atividades epileptiformes não-sinápticas (AENS) ocorre uma redução progressiva do pH no citoplasma neuronal e no meio extracelular.

O pH pode ser modulado diretamente pelo transporte de H^+ , por exemplo, por meio do trocador H^+/Na^+ ou pela bomba de H^+ , ou indiretamente, por alterações da concentração de HCO_3^- , causadas pela ativação de trocadores como o trocador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ [7]. Como durante as AENS ocorrem intensas movimentações iônicas que podem ativar esses transportadores de H^+ e HCO_3^- , a atuação desses mecanismos pode explicar o comportamento do pH durante as AENS.

Com o objetivo de elucidar quais transportadores iônicos de H^+ e HCO_3^- seriam suficientes para descrever a acidificação intra- e extracelular observada durante as atividades epileptiformes, o objetivo do presente trabalho foi investigar, por meio de modelagem matemática e simulações computacionais, as alterações de pH e seus efeitos durante as AENS.

Materiais e Métodos

Modelo para AENS - No modelo para simular as AENS [6], a camada granular do giro dentado do hipocampo de rato é representada por uma rede de unidades funcionais. Cada unidade funcional é composta pelo corpo celular de um neurônio e um segmento glial, associados a um compartimento

extracelular. Para simular a manobra experimental para indução de AENS, a solução de banho do tecido foi representada por duas camadas de compartimentos formando a base e as faces laterais da camada de corpos celulares. Esses compartimentos extracelulares têm suas concentrações iônicas mantidas constantes ($[Na^+]^o=130mM$, $[K^+]^o=4mM$ e $[Cl^-]^o=130mM$) e representam a solução de perfusão do tecido em experimentos.

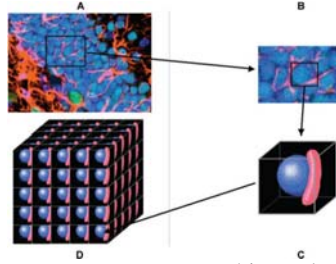


Figura 1: Representação esquemática das interfaces neurônios/extracelular/células gliais. (A) imagem da camada granular do GD; (B) os constituintes básicos; (C) unidade funcional formada por glia, neurônio e extracelular circundante; (D) rede tridimensional [extraído de 6].

Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- são as espécies iônicas representadas. A movimentação de cada espécie iônica no meio extracelular é descrita por uma equação de eletrodifusão [6].

A movimentação iônica através da membrana neuronal é descrita por canais iônicos dependentes de voltagem, bomba de Na/K e co-transporte K-Cl (KCC). Também são consideradas as *gap-junctions* promovendo a interconexão entre os citoplasmas de células adjacentes. Para a membrana glial, foram considerados canais iônicos com permeabilidades constantes, bomba de Na/K, o co-transporte Na-K-2Cl (NKCC) e trocadores HCO_3^-/Cl^- e H^+/Na^+ . A densidade de corrente iônica, através dos canais correspondentes, é calculada pela equação de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) para corrente. Nos casos da bomba de Na/K e co-transportes KCC e NKCC, os fluxos iônicos foram determinados considerando as reações dos íons com as respectivas enzimas transportadoras [6].

Para calcular a densidade de corrente, através das *gap-junctions*, a equação de Nernst-Planck [6] é aplicada de forma discreta a cada uma das espécies iônicas. Para o efeito de campo elétrico entre neurônios, que é outro tipo de conexão não-sináptica, é assumido que a corrente gerada por um neurônio afeta outros neurônios, com efeito dependente da distância.

Para o cálculo do potencial transmembrana, admite-se o equilíbrio dinâmico para o qual o somatório das correntes transmembrânicas é nulo e deriva-se uma equação equação de GHK de potencial modificada.

O modelo também considera a variação dos volumes intra- e extracelulares. A equação para o cálculo do volume intracelular, neuronal ou glial, é derivada admitindo o equilíbrio osmótico em cada instante de tempo e que o volume total é constante.

Comportamento do pH – Para descrever as variações de pH no modelo para AENS, os níveis de pH

intra- e extracelulares foram determinados pelas concentrações de HCO_3^- e H^+ [7]. No meio extracelular, a movimentação desses íons foi descrita pela equação de eletrodifusão [6]. Considerando o meio extracelular uma fonte infinita de CO_2 [7], a seguinte reação contribui para equilibrar o nível de pH nos meios intra- e extracelular:



A partir dessa reação, as taxas de variação das concentrações de H^+ e HCO_3^- foram dadas por:

$$\left(\frac{\partial [H^+]^m}{\partial t}\right)_{AC} = v_{AC}^m ([H^+]^m [HCO_3^-]^m - Kd_{AC}^m [H_2O]^m [CO_2]^m) \quad (2)$$

$$\left(\frac{\partial [HCO_3^-]^m}{\partial t}\right)_{AC} = v_{AC}^m ([H^+]^m [HCO_3^-]^m - Kd_{AC}^m [H_2O]^m [CO_2]^m) \quad (3)$$

onde m representa o meio (extracelular ou intracelular), v_{AC} é uma constante de proporcionalidade que traduz o efeito da anidrase carbônica aumentando a velocidade da reação e Kd_{AC}^m é a constante de equilíbrio da reação.

Para descrever as alterações de pH causadas pelas atividades neuronal e glial, os seguintes transportadores iônicos foram representados: trocador iônico H^+/Na^+ (NHE), trocador HCO_3^-/Cl^- (HCE) e bomba de H^+ .

Considerando as reações de Na^+ e H^+ com a enzima trocadora em equilíbrio em cada instante de tempo e que o NHE pode inverter a direção do transporte iônico em função dos gradientes de Na^+ e H^+ , a seguinte equação para o cálculo do fluxo iônico promovido pelo NHE foi derivada:

$$\phi_{H/Na} = Q_{H/Na} \left\{ \frac{[H^+]^i [Na^+]^o}{([H^+]^i + Kd_{H/Na}^{i,NHE} (1 + \frac{[Na^+]^i}{Kd_{Na}^{i,NHE}})) ([Na^+]^o + Kd_{H/Na}^{o,NHE} (1 + \frac{[H^+]^o}{Kd_{H/Na}^{o,NHE}}))} - \frac{[H^+]^o [Na^+]^i}{([H^+]^o + Kd_{H/Na}^{o,NHE} (1 + \frac{[Na^+]^o}{Kd_{Na}^{o,NHE}})) ([Na^+]^i + Kd_{H/Na}^{i,NHE} (1 + \frac{[H^+]^i}{Kd_{H/Na}^{i,NHE}}))} \right\} \quad (4)$$

onde $Q_{H/Na}$ é uma constante e $Kd_{ion}^{i,NHE}$ e $Kd_{ion}^{o,NHE}$ são as constantes de dissociação do *ion* (Na^+ ou H^+) nas faces intra e extracelular, respectivamente.

De forma análoga ao NHE, a seguinte equação foi derivada para o fluxo iônico promovido pelo trocador HCE:

$$\phi_{HCO_3/Cl} = Q_{HCO_3/Cl} \left\{ \frac{[HCO_3^-]^i [Cl^-]^o}{([HCO_3^-]^i + Kd_{HCO_3/Cl}^{i,HCE} (1 + \frac{[Cl^-]^i}{Kd_{Cl}^{i,HCE}})) ([Cl^-]^o + Kd_{HCO_3/Cl}^{o,HCE} (1 + \frac{[HCO_3^-]^o}{Kd_{HCO_3/Cl}^{o,HCE}}))} - \frac{[HCO_3^-]^o [Cl^-]^i}{([HCO_3^-]^o + Kd_{HCO_3/Cl}^{o,HCE} (1 + \frac{[Cl^-]^o}{Kd_{Cl}^{o,HCE}})) ([Cl^-]^i + Kd_{HCO_3/Cl}^{i,HCE} (1 + \frac{[HCO_3^-]^i}{Kd_{HCO_3/Cl}^{i,HCE}}))} \right\} \quad (5)$$

onde $Q_{HCO_3/Cl}$ é uma constante que permite ajustar a intensidade do fluxo do trocador, $Kd_{ion}^{i,HCE}$ e $Kd_{ion}^{o,HCE}$ são as constantes de dissociação do *ion* (HCO_3^- ou Cl^-) nas faces intra e extracelular, respectivamente.

A bomba de H^+ também foi calculada considerando as reações de H^+ e ATP, com a enzima, em equilíbrio em cada instante de tempo:

$$\phi_{H/Na} = P_H \left[\frac{[H^+]^i [ATP]^i}{([H^+]^i + Kd_{H/Na}^i) ([ATP]^i + Kd_{ATP}^i)} \right] \quad (6)$$

onde P_H é uma constante de proporcionalidade e Kd_H^i e Kd_{ATP}^i são as constantes de dissociação de H e ATP na face intracelular.

As constantes das equações 2-6 foram ajustadas simulando as alterações de pH nos meios intra- e extracelular, durante as AENS, registradas por [4,5].

Recursos Computacionais – As equações foram resolvidas numericamente pelo método das diferenças finitas, considerando um erro máximo de 10^{-4} . A linguagem computacional foi o FORTRAN 90. Para as simulações, foi necessário paralelizar o código do programa para executá-lo em um cluster com 04 estações de trabalho (Intel® Core™ I7 CPU, 2.95 Hz, 8GB RAM, 1TB HD).

Resultados

Nas simulações computacionais de AENS, o aumento da $[K^+]$ nos compartimentos representativos da solução de banho das fatias de hipocampo causa a difusão desse íon para a região dos corpos celulares e, conseqüentemente, o influxo de Cl^- em neurônios [6]. Portanto, ocorre a despolarização das células e surgem as descargas epileptiformes não-sinápticas (Figura 2). Como em manobras experimentais com fatias de hipocampo de rato, o potencial extracelular simulado

apresenta uma variação lenta e negativa da linha de base, somada à ocorrência de *population spikes* (Figura 2A). Em relação às concentrações iônicas, ocorrem o acúmulo de K^+ e reduções das concentrações de Cl^- e Na^+ , no meio extracelular. Simultaneamente, observam-se, em neurônios, a redução da $[K^+]$ e o aumento das $[Cl^-]$ e $[Na^+]$. Em glias, a $[Na^+]$ sofre pequenas flutuações e ocorre o acúmulo de Cl^- e K^+ .

O comportamento do pH para a mesma simulação descrita acima está apresentado na Figura 2B. Como observado nas manobras experimentais de Xiong e Stringer [4,5], durante o período ictal, ocorre acidificação no citoplasma neuronal e no meio extracelular. Simultaneamente, observa-se a alcalinização glial. Essas alterações estão associadas com o aumento da $[H^+]$ no meio extracelular e em neurônios e com sua redução em glias (Figura 2C). Em relação ao HCO_3^- , ocorreram o seu acúmulo em neurônios e glias e redução no meio extracelular (Figura 2D). Os níveis de H^+ e HCO_3^- são restabelecidos durante o período interictal, retornando o valor do pH para os valores de equilíbrio, tanto em neurônios e glias, quanto no meio extracelular. Na parte inferior das Figura 2C e D, são apresentadas as taxas de variação das concentrações de H^+ e HCO_3^- provocadas por cada um dos mecanismos descritos no modelo.

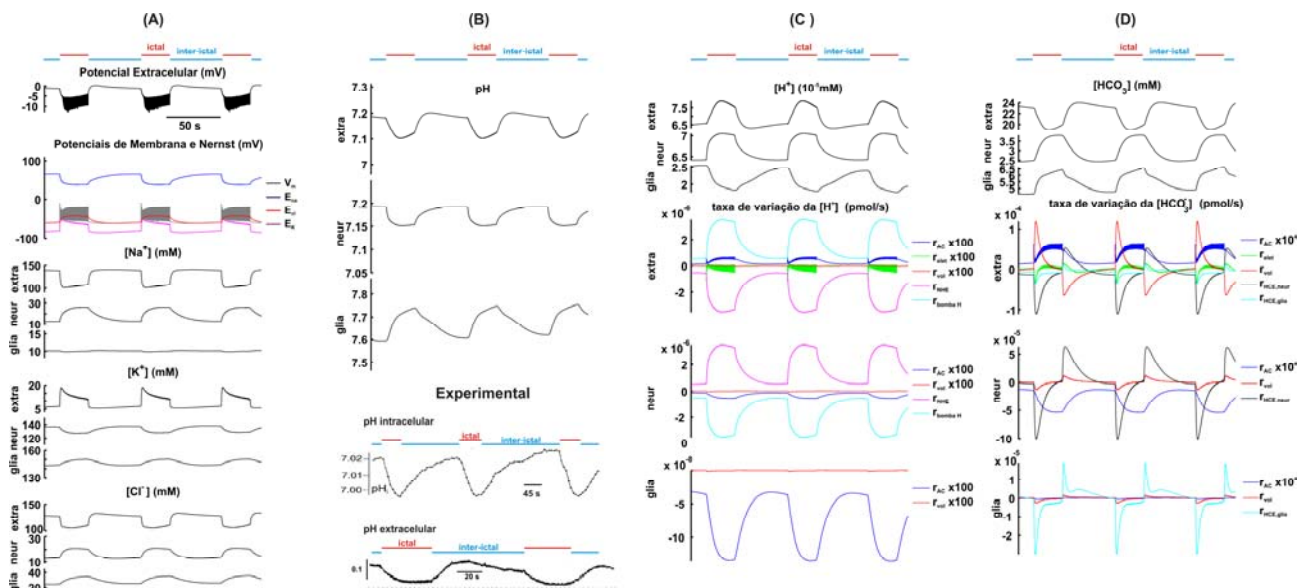


Figura 2 – Simulação de AENS, reproduzindo o comportamento do pH. (A) Concentrações iônicas e potenciais extra- e intracelular. (B) pH nos meios extracelular e intracelular neuronal e glial. Abaixo, para comparação, pH neuronal e extracelular experimentais, extraídos de [4,5]. (C) $[H^+]$ nos meios extra- e intracelulares e taxas de variação da $[H^+]$ causadas pelos diferentes mecanismos considerados. (D) $[HCO_3^-]$ nos meios extra- e intracelulares e taxas de variação da $[HCO_3^-]$. Símbolos: AC – anidrase carbônica, elet – eletrodifusão, vol – variação de volume, NHE – trocador Na^+/H^+ , bomb H – bomba de H^+ , HCE – trocador Cl^-/HCO_3^- .

Investigando o efeito da variação do pH sobre as AENS, na Figura 3, foram feitas simulações em que a permeabilidade de Na^+ através dos canais iônicos reduz em função da redução do pH extracelular, conforme obtido experimentalmente por [8]. Pode-se observar que a redução que ocorre no pH extracelular diminui a excitabilidade da rede neuronal, diminuindo a duração dos eventos (Figura 3A). Adicionalmente, a dinâmica de alteração das permeabilidades iônicas em função do pH

levam ao surgimento de pós-eventos no fim do período ictal. Esse tipo de pós evento surge normalmente quando são aplicadas drogas, como ouabaína e amilorida, que afetam mecanismos de transportes iônico [9]. Assim, as simulações sugerem que essas drogas podem gerar os pós-eventos, que prolongam o período ictal, por meio de alterações do pH extracelular. Neste caso, a redução da permeabilidade de sódio antecipa o ponto crítico de término do evento favorecendo o efeito

hiperpolarizante da corrente eletrogênica da bomba. Nesse momento, o pH tende a ser reestabelecido e reinicia, momentaneamente, o evento (dados das simulações correspondentes a essa descrição não apresentados). Como observado em manobras experimentais, ocorre o bloqueio das AENS quando o pH é reduzido no meio extracelular (Figura 3B).

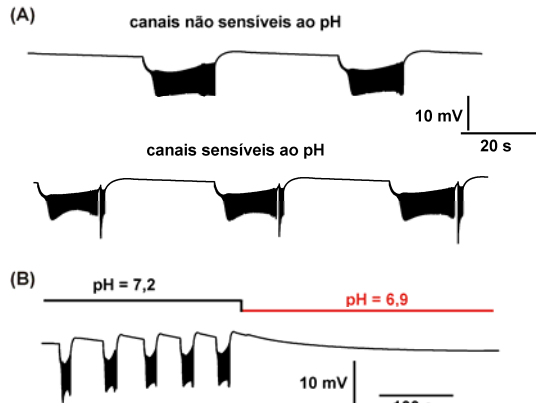


Figura 3 – Modulação dos canais iônicos pelas variações de pH extracelular afetam as AENS. (A) Simulações de AENS considerando canais de Na insensíveis (superior) e sensíveis (inferior) a pH. Observa-se o surgimento de pós-eventos no fim do período ictal quando os canais são sensíveis a pH. (B) Efeito da redução do pH extracelular bloqueando as AENS.

Discussão

O objetivo do presente trabalho foi investigar, por meio de simulações computacionais, quais mecanismos podem explicar as alterações de pH durante as AENS. Segundo [7], durante atividades epileptiformes, uma explicação para a acidificação dos meios extra- e intracelular é a produção de ácidos via atividade metabólica. As simulações do presente trabalho permitem propor uma hipótese alternativa: as alterações de pH são causadas pelos trocadores iônicos NHE e HCE, ativados pelas alterações iônicas resultantes da ocorrência dos potenciais de ação durante o evento epileptiformes. Segundo as simulações, os potenciais de ação levam ao acúmulo de Na^+ e Cl^- no meio intracelular neuronal. O acúmulo de Na^+ ativa o NHE (Figura 2C), que causa o influxo de H^+ , acidificando o citoplasma neuronal. O acúmulo de Cl^- ativa o HCE (Figura 2D), causando o influxo de HCO_3^- , que reduz a acidificação intracelular neuronal. O acúmulo de K^+ extracelular, devido ao seu efluxo por canais iônicos, causa o influxo de Cl^- em glias por meio do KCC. Portanto, a concentração intracelular de Cl^- aumenta e ativa o HCE glial (Figura 2D), causando o influxo de HCO_3^- em glias, que resulta na acidificação extracelular.

SCHWITZER et al. [10] mostraram que a redução do pH extracelular de 7,2 para 6,9 durante experimentos com fatias de hipocampo causam a supressão das atividades epileptiformes não-sinápticas. No presente trabalho, a redução do pH também causou a supressão das AENS (Figura 6B). Segundo as simulações, o principal efeito da redução do pH extracelular, que leva ao bloqueio das AENS, é a redução da permeabilidade

de Na^+ através de canais iônicos dependentes de voltagem. A redução da permeabilidade de Na^+ adianta o segundo ponto crítico de crises de AENS, o qual é caracterizado pelo instante em que o efluxo de Na^+ pela bomba de Na/K supera o seu influxo por canais iônicos, causando o término do período ictal [6].

Concluindo, o presente trabalho reforça a hipótese de que o controle do pH pode reduzir a excitabilidade neuronal e favorecer o controle de crises epileptiformes. Além disso, sugere quais mecanismos iônicos são essenciais para determinar os níveis de pH e, portanto, podem ser alvo de drogas e ou manobras experimentais para o controle das alterações de pH

Agradecimentos

À FAPEMIG, CNPq, CAPES e FINEP pelo apoio.

Referências

- [1] Bonifacio SL, Glass HC, Peloquin S, Ferriero DM. A new neurological focus in neonatal intensive care. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7, 485–494.
- [2] Rogawski M, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5, 553–564.
- [3] Pavlov I, Kaila K, Kullmann DM, Miles R. (2012) Cortical inhibition, pH and cell excitability in epilepsy: what are optimal targets for antiepileptic interventions? *J Physiol*. 2012 591(4):765-74.
- [4] Xiong ZQ, Saggau P, Stringer JL. Activity-dependent intracellular acidification correlates with the duration of seizure activity. *J Neurosci.*, 2000, 20(4), 1290-1296.
- [5] Xiong ZQ, Stringer JL. Extracellular pH Responses in CA1 and the Dentate Gyrus During Electrical Stimulation, Seizure Discharges, and Spreading Depression. *J Neurophysiol*, 2000, 83:3519-3524.
- [6] Almeida, A.C.G, Rodrigues, AM, Scorza, FA, Cavalheiro, EA, Teixeira, HZ, Duarte, MA, Silveira, GA, Arruda, EZ, Mechanistic Hypotheses for Nonsynaptic Epileptiform Activity Induction and its Transition from the Interictal to Ictal State – Computational Simulation, *Epilepsia*, 2008, 9(11): 1904-1928.
- [7] Chesler M. Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev*. 2003, 83(4): 1183-1221.
- [8] Tombaugh G. C., Somjen G. G. Effects of extracellular pH on voltage-gated Na^+ , K^+ and Ca^{2+} currents in isolated rat CA1 neurons. *J. Physiol.*, 1996, 493: 719–732.
- [9] MIRANDA, M. F., Mecanismos Alvos Para a Finalização de Eventos Epileptiformes Não-Sinápticos [tese], São João Del-Rei (UFSJ); 2014.
- [10] Schweitzer JS, Wang H, Xiong ZQ, Stringer JL. pH Sensitivity of non-synaptic field bursts in the dentate gyrus. *J Neurophysiol.*, 2000, 84(2): 927-933.