

# EFEITOS DO GABA EXCITATÓRIO SOBRE A SINAPTOGÊNESE APÓS O STATUS EPILEPTICUS – SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS

K. L. A. França\*, A. C. G. Almeida\* e A. M. Rodrigues\*

\*Universidade Federal de São João del-Rei, São João del Rei, Brasil

e-mail: keitefranca@yahoo.com.br

**Resumo:** A inibição sináptica no giro dentado ocorre principalmente via o neurotransmissor GABA, liberado pelos interneurônios. Durante a fase latente, pós *status epilepticus*, é observado que esse neurotransmissor tem efeito excitatório, causado por um acúmulo de Cl<sup>-</sup> intracelular. O objetivo do presente trabalho foi investigar, por meio de simulações computacionais, os efeitos da variação de polaridade do GABA, de inibitório para excitatório, sobre a sinaptogênese durante o período de latência observado em protocolos experimentais de indução de epilepsia. O modelo de rede neuronal descreve os principais tipos celulares no giro dentado do hipocampo. As regras de Hebb e anti-Hebbiana e a teoria da Compensação foram utilizadas para representar a sinaptogênese. Foram incorporados os efeitos dos mecanismos não-sinápticos sobre a atividades neuronal para simulação das atividades epileptiformes. As simulações permitem propor que a inversão do efeito do GABA contribui para o surgimento de atividades epileptiformes intensificando, principalmente, as interconexões sinápticas excitatórias entre células granulares, que descreve o brotamento anormal de fibras musgosas, e inibitórias entre interneurônios.

**Palavras-chave:** Sinaptogênese, rede neuronal, GABA excitatório, interneurônios inibitórios, epilepsia.

**Abstract:** GABA neurotransmitter released by interneurons is responsible for the inhibition of the neurons in the dentate gyrus. During the latent phase, post status epilepticus, it is observed that this neurotransmitter produces excitatory effect, caused by an accumulation of Cl<sup>-</sup> in neurons. The goal of this study was to investigate, by means of computational simulations, the effects of varying GABA polarity, from excitatory to inhibitory, on synaptogenesis during the latent period in experimental protocols of epilepsy. The neural network model describes the major cell types in the dentate gyrus of the hippocampus. The rules of Hebb and anti-Hebbian and the compensation theory were used to represent the synaptogenesis. The effects of non-synaptic mechanisms on neuronal activities were incorporated to simulate epileptiform activities. The simulations suggest that the excitatory effect of GABA contributes to the epileptiform activity induction by increasing excitatory synaptic interconnections between granular cells, which describes the abnormal mossy fiber sprouting, and between inhibitory interneurons.

**Keywords:** Synaptogenesis, neural network, excitatory GABA, inhibitory interneurons, epilepsy.

## Introdução

A epilepsia é uma das desordens neurológicas crônicas mais comuns, podendo ser caracterizada por um aumento na sincronização da rede neuronal e da excitabilidade celular. Esse fenômeno de hiperexcitabilidade pode ser decorrente de uma diminuição na regulação da inibição sináptica, o que leva a um desequilíbrio entre a excitação e inibição. Nesse sentido, várias pesquisas têm incidido sobre o papel da transmissão GABAérgica nas diferentes fases da progressão da doença, já que alterações na sinalização do GABA, que incluem mudanças nas propriedades de interneurônios, estão intimamente envolvidas no desenvolvimento e manifestações crônicas da atividade epileptiforme [1].

A indução experimental de *status epilepticus* (SE) produz mudanças rápidas e robustas na plasticidade neuronal. Adicionalmente, ocorre o desenvolvimento da fármacorresistência de drogas antiepilépticas convencionais que aumentam a transmissão GABAérgica. Essas observações levam à hipótese de que, após o SE, as células em cisto perdem a entrada sináptica excitatória, principalmente devido à vulnerabilidade das células musgosas, e que subsequentemente essa entrada excitatória é restaurada [2] devido o brotamento anormal das fibras musgosas (BAFM). Já na fase crônica da epilepsia, é observado um aumento na proporção da unidade glutamatérgica/GABAérgica.

De acordo com Sloviter *et al.* [2], o principal obstáculo para o entendimento da epileptogênese está no período de silêncio, fase latente, entre a lesão inicial e o desenvolvimento de crises espontâneas. Diante disso, o intuito desse trabalho foi investigar, por meio de simulações computacionais, os efeitos da variação de polaridade do GABA, de inibitório para excitatório, sobre a sinaptogênese durante o período de latência observado em protocolos experimentais de indução de epilepsia.

## Materiais e métodos

**Modelo da rede neuronal** – O modelo de rede neuronal utilizado foi construído considerando o número total de células, e a proporção entre os principais

tipos celulares presentes no hipocampo [3]. A rede é composta por  $N$  neurônios, onde  $NE < N$  é o número de neurônios excitatórios, e,  $N-NE$  corresponde às células inibitórias. Os neurônios excitatórios foram divididos em  $\{1, \dots, NE-3\}$  células granulares (CG), e,  $\{NE-2, \dots, NE\}$  células musgosas (CM) hilares, enquanto que os neurônios inibitórios,  $\{NE+1, \dots, N\}$ , são representados pelos interneurônios (IN). Esses três tipos celulares formam 9 grupos de conectividade (I a IX). A matriz de conexão entre os neurônios é dada por  $C(N \times N)$ :

$$C = \begin{bmatrix} c_{1,1} & \dots & c_{1,NE-3} & c_{1,NE-2} & \dots & c_{1,NE} & c_{1,NE+1} & \dots & c_{1,N} \\ c_{NE-3,1} & \dots & c_{NE-3,NE-3} & c_{NE-3,NE-2} & \dots & c_{NE-3,NE} & c_{NE-3,NE+1} & \dots & c_{NE-3,N} \\ c_{NE-2,1} & \dots & c_{NE-2,NE-3} & c_{NE-2,NE-2} & \dots & c_{NE-2,NE} & c_{NE-2,NE+1} & \dots & c_{NE-2,N} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ c_{NE,1} & \dots & c_{NE,NE-3} & c_{NE,NE-2} & \dots & c_{NE,NE} & c_{NE,NE+1} & \dots & c_{NE,N} \\ c_{NE+1,1} & \dots & c_{NE+1,NE-3} & c_{NE+1,NE-2} & \dots & c_{NE+1,NE} & c_{NE+1,NE+1} & \dots & c_{NE+1,N} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ c_{N,1} & \dots & c_{N,NE-3} & c_{N,NE-2} & \dots & c_{N,NE} & c_{N,NE+1} & \dots & c_{N,N} \end{bmatrix}, \quad (1)$$

onde  $c_{ij}$   $1 \leq i, j \leq N$  é o peso da conexão a partir do neurônio  $j$  sobre o neurônio  $i$ .

Adicionalmente, para a representação do efeito de mecanismos não-sinápticos durante os períodos ictal e inter-ictal [4], os estados de atividade neuronal foram distinguidos em estado de despolarização prolongada (que representa o período ictal de atividades epileptiformes), e estado polarizado (que representa o período inter-ictal). Segundo Almeida *et al.* [4], a transição do período inter-ictal para o ictal, que caracteriza o início de uma descarga epileptiforme, ocorre quando o influxo de  $Na^+$  por canais iônicos supera o seu efluxo pela bomba de  $Na^+/K^+$ . Por outro lado, a transição do período ictal para o inter-ictal, que determina o término de uma descarga epileptiforme, ocorre quando o efluxo de  $Na^+$  pela bomba de  $Na^+/K^+$  supera o seu influxo por canais iônicos. Descrevendo o comportamento desses dois fluxos de  $Na^+$ , que permitem caracterizar o início e término de uma descarga epileptiforme,  $NS_i^t$  é calculado considerando uma componente de excitação (NSE) e outra de inibição (NSI):

$$NS_i^t = a \cdot NSE_i^t - b \cdot NSI_i^t, \quad (2)$$

onde  $a$  e  $b$  são parâmetros que permitem ajustar a contribuição da excitação e inibição sobre  $NS_i^t$ .

**Alterações de conectividade da rede neuronal** – O modelo de sinaptogênese foi baseado nas regras Hebbiana e anti-Hebbiana [5] e na teoria da Compensação [6]. Assim, em cada passo de tempo morfológico, cada neurônio pode apresentar deslocamentos de sua atividade de entrada causados por adaptações estruturais. Em consequência, o desvio de cada neurônio de uma atividade média desejada é chamado estado morfológico do neurônio,  $\Delta s_i$ , o qual é calculado para a célula  $i$  da seguinte forma:

$$\Delta s_i = s_i - 0,2, \text{ com } s_i = \frac{\sum_{t_0}^{t_0+\Delta t} prob(z_i^t)}{\Delta t}, \quad (3)$$

onde  $t_0, \Delta t \in \mathbb{N}$ ,  $i = 1, \dots, N$ .  $s_i$ , utilizada como medida da atividade do neurônio  $i$ , é a probabilidade média de disparo.

De acordo com a teoria da Compensação [6], a soma das ofertas sinápticas do  $i$ -ésimo neurônio é definida como  $\sigma_i$  e sua variação como  $\Delta \sigma_i$ . Os tipos de sinapses são separados em elementos pré-sinápticos (pr) e pós-sinápticos (po), estes por sua vez, são divididos em: ligados (b) e livres (f). Os elementos pós-sinápticos são também distinguidos em: excitatórios (e), ou inibitórios (i). As regras morfológicas (Tabela 1), que determinam as variações de conectividade sináptica, dependem do estado morfológico de um neurônio,  $\Delta s_i$ , do estado estrutural do neurônio e também da sensibilidade da célula para reagir com variações estruturais (v).

Tabela 1: Regras Morfológicas [6].

Neurônio em estado elevado	Neurônio em baixo estado
$\Delta \sigma_i^{bpr} = 0$	$\Delta \sigma_i^{bpr} = -k_{bpr}^L \sigma_i^{bpr}  \Delta s_i  < 0$
$\Delta \sigma_i^{bepo} = -k_{bepo}^H \sigma_i^{bepo}  \Delta s_i  < 0$	$\Delta \sigma_i^{bepo} = 0$
$\Delta \sigma_i^{bipo} = 0$	$\Delta \sigma_i^{bipo} = -k_{bipo}^L \sigma_i^{bipo}  \Delta s_i  < 0$
$\Delta \sigma_i^{fpr} = k_{fpr}^H  \Delta s_i  > 0$	$\Delta \sigma_i^{fpr} = -k_{fpr}^L \sigma_i^{fpr}  \Delta s_i  \leq 0$
$\Delta \sigma_i^{fepo} = -k_{fepo}^H \sigma_i^{fepo}  \Delta s_i  \leq 0$	$\Delta \sigma_i^{fepo} = k_{fepo}^L  \Delta s_i  > 0$
$\Delta \sigma_i^{fipo} = k_{fipo}^H  \Delta s_i  > 0$	$\Delta \sigma_i^{fipo} = -k_{fipo}^L \sigma_i^{fipo}  \Delta s_i  \leq 0$

O potencial transmembrânico ( $MP_i^t$ ) é calculado, no instante  $t$ , em função dos pesos sinápticos e do estado de atividade do neurônio  $i$ , no instante  $t-1$  ( $z_i^{t-1}$ ):

$$MP_i^t = \tau \sum_{j=1}^{NE-3} c_{i,j} z_j^{t-1} + \kappa \sum_{j=NE-2}^{NE} c_{i,j} z_j^{t-1} - \varphi \sum_{j=NE+1}^N c_{i,j} z_j^{t-1} + NS_i^t, \quad (4)$$

onde  $\tau, \kappa$  e  $\varphi$  correspondem aos pesos de conectividade de cada tipo celular presente na rede, e  $NS_i^t$  é a contribuição de mecanismos não-sinápticos sobre o potencial transmembrânico.

**Circuitaria inicial e parâmetros do modelo**—Em uma escala reduzida de 1:10.000 a rede foi construída, considerando 99 células granulares, 3 células musgosas, e, 3 interneurônios. Os valores iniciais dos elementos da matriz de conectividade,  $c_{ij}$ , seguiram uma distribuição normal com média e desvio padrão dados por  $1,0 \pm 0,2$  para células conectadas e 0 para células não conectadas.

Um passo morfológico no modelo ( $\Delta t$ ) corresponde ao remodelamento de espículas. No presente trabalho, foi considerado que cada passo morfológico apresenta 150 iterações  $t$  e que cada iteração  $t$  corresponde a 0,36 min.

**Simulação da Indução de Atividades Epileptiformes** – Em 1,5 dia, uma despolarização foi induzida para gerar um aumento de atividade da rede, que caracteriza o SE induzido em manobras experimentais. Após o aumento de atividade, o efeito dos IN foi alterado de inibitório para excitatório para representar a alteração de polaridade do GABA durante o período pós-SE. No presente trabalho, foram estudados os efeitos da alteração do tempo que o GABA permanece excitatório. Baseado no trabalho de Pathak *et al.* [7], foi considerado que 20 % das CG ficam reativas ao GABA excitatório (GE) e que o período do GE pode durar até 25 dias

**Resultados**

O aumento do período de atuação do GE elevou o número de aumentos espontâneos de atividade (AEA) na rede de neurônios (Figura 1A - Esquerda), ao mesmo tempo em que reduziu o período de latência (Figura 1A - Direita) para a ocorrência de atividades.

Analisando as alterações de conectividade dos tipos celulares presentes na rede (Figura 1B), após a ocorrência dos AEA que representam as descargas epileptiformes, observa-se que o GE causa as seguintes alterações: (1) aumento das interconexões entre CG (grupo I) e entre os IN (grupo IX); (2) redução das conectividades envolvendo as CM (grupos II, IV, V, VI e VIII); (3) aumento da inibição das CG (grupo VII).

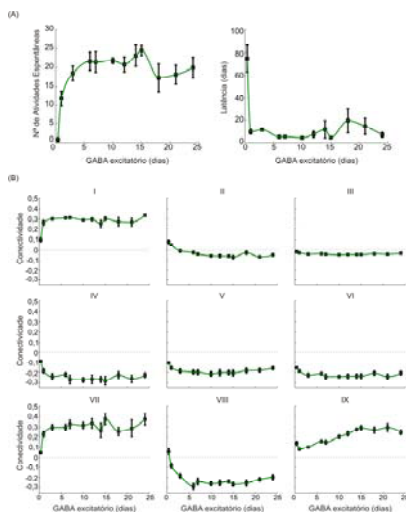


Figura 1: (A) Esquerda – Número de atividades espontâneas. Direita – Período de latência. (B) Conectividade média dos grupos formados. Para cada duração do GE, foram realizadas 6 simulações.

Considerando a evolução temporal, após o primeiro aumento de atividade que representada o SE, o período de GE causa um aumento de atividade (Figura 2A) que resulta em alterações da conectividade (Figura 2B).

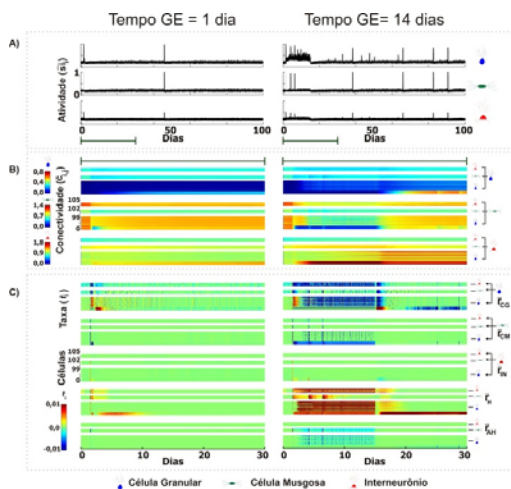


Figura 2: (A) Atividade, (B) Conectividade, e (C) Taxas de  $v$  e  $\rho$  para 1 e 14 dias de GE, respectivamente.

Essas alterações estão relacionadas à redução da taxa da teoria da Compensação ( $r$ ) para os grupos I e IV, e aumento para o grupo III, com concomitante aumento

da taxa das regras anti-Hebbianas ( $r_{AH}$ ) e redução da taxa das regras de Hebb ( $r_H$ ). A principal variação na conectividade foi o aumento nos grupos I, VII e IX, e redução nos demais grupos (Figura 2C).

A análise da variação das regras de Hebb ( $\rho$ ) em combinação com a teoria da Compensação ( $v$ ) (Figura 3) mostrou que a evolução do período do GE influenciou no AEA para maiores valores de  $v$  e não nulos de  $\rho$ . O aumento desse período elevou o AEA para mais combinações de  $v$  e  $\rho$ , sendo mais intenso à medida que as taxas das duas regras estudadas aumentaram, consequentemente, reduziu o tempo de latência para o início das atividades.

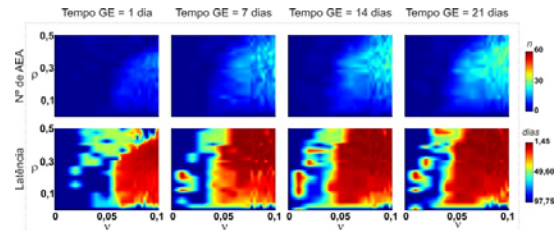


Figura 3: Aumento espontâneo de atividade (AEA) para a combinação de diferentes valores de  $v$  e  $\rho$ . Para cada duração do GE, foram realizadas 400 simulações.

**Discussão**

As epilepsias têm sido frequentemente associadas a déficits na sinalização GABAérgica [1], que podem ser provocados por alterações no equilíbrio entre cotransportadores cátion/ $Cl^-$  do tipo NKCC1 e KCC2 [8]. Em situações em que há um aumento na expressão de NKCC1, responsável pelo influxo de  $Cl^-$ , e redução do KCC2, que promove a extrusão desse íon, ocorre um maior influxo de  $Cl^-$ , e consequentemente, a inversão do potencial de reversão da corrente através dos canais com receptores GABA<sub>A</sub> (receptor ionotrópico do tipo A), despolarizando a membrana neuronal. Evidências clínicas e experimentais indicam que esse tipo de perturbação na sinalização do GABA<sub>A</sub> poderia facilitar as crises, uma vez que a diminuição na regulação sináptica induziria um desequilíbrio entre excitação e inibição [9], comprometendo a inibição e contribuindo, potencialmente, para a epileptogênese.

Nas simulações, o aumento do período de inversão da polaridade do GABA contribuiu para um maior número de AEA (Figura 1A - Esquerda). Durante os 2 primeiros dias de inversão, devido ao aumento da taxa da teoria da Compensação e das regras de Hebb, as CM reduziram à atuação sobre os demais tipos celulares presentes na rede ao mesmo tempo em que ocorreu o aparecimento e intensificação da conectividade sináptica excitatória entre as CG, caracterizando o BAFM (Figura 1B – grupo I). Essas alterações poderiam indicar a ocorrência de uma forma muito rápida de reversão do papel do GABA [10], entre 3 horas e 2 dias após o trauma, que já seria suficiente para alterar os padrões de ativação por meio da reorganização dos circuitos [11] na rede neuronal.

Todas essas mudanças ocorridas na rede em resposta à injúria, que caracterizam a sinaptogênese, podem ser correlacionadas com danos provocados pelo BAFM

observados em pacientes com epilepsia de lobo temporal [11]. As simulações indicam que o BAFM surge como uma tentativa da rede em restaurar as funções normais do tecido após o aumento da inibição ocorrido durante o SE. No fim desse período, a inibição mais eficiente causa um maior decaimento da atividade neuronal e, conseqüentemente, aumenta as taxas da teoria da Compensação e das regras de Hebb (Figura 2), que são responsáveis pela intensificação do BAFM. Portanto, os resultados apontam que a intensidade do BAFM pode ser dependente do período de inversão da polaridade do GABA. As mudanças ocorridas na inibição pós SE podem limitar o aumento de excitabilidade das CG induzido pelo SE quando o BAFM está baixo, sendo que as modificações na reorganização estrutural e a perda celular associadas com a epileptogênese podem prejudicar esse potencial mecanismo compensatório e fornecer o substrato epileptogênico ao hipocampo [9].

Adicionalmente às observações pertinentes aos 2 primeiros dias de inversão da polaridade do GABA, a progressão desse período induz um aumento na conectividade entre os IN, que contribui para a desinibição (ou excitação) da rede. Estudos anatômicos e eletrofisiológicos já forneceram evidências de que as células GABAérgicas, na formação hipocampal, podem inervar umas as outras, apontando que os próprios IN podem ser controlados por meio de mecanismos inibitórios específicos [12]. A eficácia das sinapses GABAérgicas pode ser reduzida por essas interconexões inibitórias, facilitando o surgimento das crises.

A plasticidade sináptica é fundamental à habilidade de um sistema neural em aprender, bem como na capacidade de desenvolver crises espontâneas. Embora os mecanismos Hebbianos sejam importantes na modificação seletiva dos circuitos neuronais, tendem a desestabilizar a atividade das redes. Por isso, essas regras tendem a atuar em conjunto com várias formas de plasticidade homeostática, que estabilizam as propriedades dos circuitos neuronais [13]. Para as combinações dos efeitos das duas regras de sinaptogênese que resultaram em atividades recorrentes (Figura 3), o aumento do período de inversão do GABA intensificou a conectividade entre as CG e entre os IN, elevando a atividade da rede de forma a aumentar o número de atividades espontâneas.

O modelo utilizado no presente trabalho não permite uma análise precisa do efeito dos transportadores iônicos (tais como canais iônicos, bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e cotransportadores) sobre a homeostase do tecido e, portanto, sobre a indução das atividades epileptiformes e a sinaptogênese. Porém, o modelo descreve a circuitaria sináptica do giro dentado e permite o estudo de propriedades inerentes à reorganização e formação de sinapses dependentes da atividade. Nesse sentido, as simulações permitem propor que, no período pós SE, a inversão do efeito do GABA, de inibitório para excitatório, contribui para o surgimento de atividades epileptiformes intensificando, principalmente, as interconexões sinápticas excitatórias entre CG, que

descreve o BAFM, e inibitórias entre IN. Portanto, as simulações sugerem que, adicionalmente ao efeito do BAFM, a inibição recíproca entre IN pode contribuir para o surgimento das atividades epileptiformes.

#### Agradecimentos

Agradecemos à FAPEMIG, CNPq, UFSJ e CAPES.

#### Referências

- [1] Kaila K., Ruusuvuori E., Seja P., Voipio J., Puskarjov M. GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. *Curr Opin Neurobiol.* 2014; 26:34–41.
- [2] Sloviter R.S., Bumanglag A.V., Schwarcz R., Frotscher M., Abnormal dentate gyrus network circuitry in temporal lobe epilepsy. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies.* 2012; 1-20.
- [3] França K.L.A., Almeida A.C.G., Infantsi A.F.C., Duarte M.A., Silveira G.A., Scorza F.A., Arida R.M., Cavalheiro E.A., Rodrigues A.M. Enhanced Synaptic Connectivity in the Dentate Gyrus during Epileptiform Activity: Network Simulation. *Computational Intelligence and Neuroscience.* 2013; 1-19.
- [4] Almeida A.C.G., Rodrigues A.M., Scorza F.A., Cavalheiro E. A., Teixeira H.Z., Duarte M.A., Silveira G.A., Arruda E.Z. Mechanistic Hypotheses for nonsynaptic epileptiform activity induction and its transition from the interictal to ictal state – Computational Simulation. *Epilepsia.* 2008; 1908–24.
- [5] Hebb D.O. *The organization of behavior: A neuropsychological theory.* New York:Wiley. 1949; 335p.
- [6] Wolff J. R., Wagner G.P. Selforganization in synaptogenesis: Interaction between the formation of excitatory and inhibitory synapses, In: Basar E, Flohr H, Haken H, Mandell AJ, editors. *Synergetics of the Brain*, Berlin;Heidelberg: Springer. 1983; pp.: 50–59.
- [7] Pathak H.R., Weissinger F., Terunuma M., Carlson G.C., Hsu F. C., Moss S.J., Coulter D. A. Disrupted Dentate Granule Cell Chloride Regulation Enhances Synaptic Excitability during Development of Temporal Lobe Epilepsy. *J Neurosci.* 2007; 27(51):14012–22.
- [8] Munoz A., Mendez P., DeFelipe J., Alvarez-Leefmans F.J. Cation-Chloride Cotransporters and GABAergic Innervation in the Human Epileptic Hippocampus. *Epilepsia.* 2007; 48(4):663–73.
- [9] Barmashenko G., Hefft S., Aertsen A., Kirschstein T., Köhling R. Positive shifts of the GABAA receptor reversal potential due to altered chloride homeostasis is widespread after *status epilepticus*. *Epilepsia.* 2011; 52(9):1570–78.
- [10] van den Pol A.N., Obrietan K., Chen, G. Excitatory Actions of GABA after Neuronal Trauma. *J Neurosci.* 1996; 16(13):4283–92.
- [11] Morimoto K., Fahnestock M., Racine R.J. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progress in Neurobiology.* 73: 2004; 1–60
- [12] Chamberland S., Topolnik L. Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. *Front Neurosci.* 2012; 6: 1-13.
- [13] Turrigiano GG. Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci.* 1999; 22: 221–27.