

## EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA DURANTE ATIVIDADES EPILEPTIFORMES NÃO-SINÁPTICAS EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS TRATADOS COM PILOCARPINA

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

\* Departamento de Engenharia de Biosistemas / UFSJ, São João del Rei – MG, Brasil  
email: delmonick2@gmail.com

**Resumo:** O tratamento com N-acetilcisteína (NAC) tem sido reconhecido por seus efeitos neuroprotetores. O objetivo deste trabalho foi, por meio de manobras experimentais e simulações computacionais, estudar a influência da NAC no protocolo de *status epilepticus* (SE) induzido por pilocarpina. Fatias de hipocampo de ratos, submetidos ao protocolo de SE por pilocarpina e tratados posteriormente com NAC durante 20 dias após SE, foram usadas para indução das atividades epileptiformes não-sinápticas (AENS). Adicionalmente, usando um modelo matemático que descreve a camada granular do giro dentado do hipocampo de rato, foram investigadas quais alterações de mecanismos subcelulares poderiam reproduzir os efeitos da NAC sobre as AENS. Nos experimentos, a NAC intensifica as AENS quando os ratos são submetidos ao SE. Segundo as simulações, esse efeito é causado pelo aumento da densidade celular, causado pela NAC, que fornece um maior substrato neuronal para ocorrência das AENS.

**Palavras-Chave:** N-acetilcisteína, epilepsia, pilocarpina, modelo matemático.

**Abstract:** *Treatment with N-acetylcysteine (NAC) has been associated to neuroprotective effects. The objective of this study was, by means of experimental maneuvers and computational simulations, to study the influence of NAC on the protocol of status epilepticus (SE) induced by pilocarpine. Hippocampal slices of rats, which were submitted to the pilocarpine SE protocol and subsequently treated with NAC for 20 days after SE, were used for induction of non-synaptic epileptiform activity (NSEA). Additionally, using a mathematical model that describes the granular layer of the dentate gyrus of the rat hippocampus, it was investigated which changes of subcellular mechanisms could reproduce the effects of NAC on NSEA. In the experiments, NAC intensifies NSEA when rats were subjected to SE. According to the simulations, this effect is caused by increased cell density, induced by the NAC, which provides greater neuronal substrate for the occurrence of NSEA.*

**Keywords:** *N-acetylcysteine, epilepsy, pilocarpine, mathematical model.*

### Introdução

A epilepsia é um distúrbio crônico da função cerebral caracterizada pela presença de crises epilépticas espontâneas e recorrentes que ocorrem na ausência de

uma condição tóxico-metabólica ou febril, que pode causar consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais [1]. As alterações eletrofisiológicas e histológicas na formação hipocampal são consideradas marcas registradas da epilepsia experimental induzida por pilocarpina. Este estado tem sido atribuído à atividade excessiva das células neuronais durante a crise convulsiva [1].

Considerando a epilepsia como uma desordem cerebral excitotóxica que pode levar à destruição crescente de neurônios, o tratamento com N-acetilcisteína (NAC) tem sido reconhecido por seus efeitos neuroprotetores e apontado em relatos de casos, os quais sugerem que o uso desse fármaco no tratamento de pacientes com epilepsia mioclônica progressiva do tipo 1 (EPM1) reduz episódios de convulsões [2].

Os efeitos reportados sobre a NAC motivaram investigar, no presente trabalho, por meio de manobras experimentais com fatias hipocampais de ratos e por simulação computacional, a atuação desse antioxidante sobre atividades epileptiformes não-sinápticas em animais submetidos ao modelo de *status epilepticus* (SE) induzido por pilocarpina.

### Materiais e Métodos

**Protocolo experimental** - Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram avaliados e aprovados sob o ponto de vista ético pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São João del-Rei, sob o parecer nº 023/2011, aprovado em 20/06/2011. Foram utilizados ratos da raça *Wistar* de 4 semanas de vida. Os grupos foram divididos de acordo com o tratamento: controle, salina+NAC (Sal NAC), pilocarpina+salina (Pilo Sal) e pilocarpina+NAC (Pilo NAC). Os grupos Controle (n=4) e Sal NAC (n=4) não foram submetidos ao protocolo de SE. O grupo Controle foi tratado durante 20 dias com salina (oral), e o grupo Sal NAC recebeu NAC (100 mg/Kg oral) durante o mesmo período. Os outros dois grupos, Pilo Sal (n=6) e Pilo NAC (n=5), foram submetidos ao SE induzido por pilocarpina (360mg/kg), durante 3 horas. Após esse período, receberam diazepam (10 mg/kg) para reverter o SE. O grupo Pilo Sal recebeu salina (oral) e o grupo Pilo NAC recebeu NAC (100mg/kg oral) durante os 20 dias subsequentes ao SE.

Após serem isolados, os hipocampus dos ratos foram fatiados em plano sagital, obtendo-se fatias de 400 µm. O potencial extracelular foi registrado a partir do

posicionamento de um eletrodo de registro na região do giro dentado (GD) da cada fatia amostrada. Inicialmente, as fatias hipocâmpais foram perfundidas com solução cefalorraquidiana símile normal NaCl (127,0mM), KCl (2mM), MgSO<sub>4</sub> (1,5mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,1mM), Glicose (10mM), CaCl<sub>2</sub> (2mM), e para a indução de atividades epileptiformes não-sinápticas, foi utilizada a solução cefalorraquidiana zero-Ca<sup>2+</sup> alto-K<sup>+</sup>. O aumento do K<sup>+</sup> promove o aumento da excitabilidade neuronal e a retirada dos íons Ca<sup>2+</sup> da solução provoca o bloqueio das conexões sinápticas.

**Quantificação celular** - Cortes adjacentes do hipocampo com 10 µm de espessura, corados com a técnica de Nissl [3], foram utilizados para a análise do GD. As imagens das fatias coradas foram capturadas utilizando um computador com placa de vídeo Pinnacle modelo: 8230-10068-11 e microscópio trinocular com platina motorizada e câmera CCD acoplada. A quantificação celular foi realizada por meio de estereologia, seguindo o método de [3], para estimar a densidade celular dos grupos estudados.

**Análise estatística** - Para identificar as alterações na densidade celular e na morfologia do potencial elétrico (PE) entre os grupos, a amplitude da componente DC (mV), amplitude dos *populations spikes* (PS) (mV), duração dos eventos (DE) (s) e intervalo entre eventos (IE) (s) foram medidos. Foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*, com teste *post-hoc* de *Dunn* e significância  $\alpha=0,05$ . Todos os dados normalizados são mostrados como média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM).

**Modelo para AENS** - No modelo para simular as AENS [4], 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Cl<sup>-</sup> são as espécies iônicas representadas. A movimentação de cada espécie iônica no meio extracelular é descrita por uma equação de eletrodifusão [4]. A movimentação iônica através da membrana neuronal é descrita por canais iônicos dependentes de voltagem, bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, o co-transporte Na-K-2Cl (NKCC) e trocadores HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> e H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>. 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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> e co-transportes KCC e NKCC, os fluxos iônicos foram determinados

considerando as reações dos íons com as respectivas enzimas transportadoras [4].

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 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.

Nas simulações computacionais de AENS, o aumento da [K<sup>+</sup>] 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<sup>-</sup> em neurônios [4]. Portanto, o aumento da concentração de K<sup>+</sup> extracelular e de Cl<sup>-</sup> intracelular promove a despolarização das células, causando o surgimento das descargas epileptiformes não-sinápticas. Para investigar quais mecanismos estariam associados com o efeito da NAC sobre as AENS, baseando nos resultados experimentais e em dados da literatura, parâmetros do modelo foram modificados para reproduzir o comportamento do potencial extracelular observado para os quatro grupos experimentais investigados, durante a indução das AENS.

## Resultados

O tratamento com NAC provocou alterações nos padrões eletrográficos das AENS induzidas em ratos submetidos ao SE (Figura 1A). Entre os grupos Controle e Sal NAC, o perfil eletrográfico não apresentou diferenças estatísticas significativas. O grupo Pilo Sal, em relação aos grupos não submetidos ao SE, apresenta maiores amplitudes para os PS (2,21  $\pm$  0,09 vezes) e componente DC (1,79  $\pm$  0,08 vezes) e menor duração do IE (0,81  $\pm$  0,03 vezes). Em relação ao Controle, o grupo Pilo NAC apresentou maior amplitude para a componente DC (2,31  $\pm$  0,05 vezes), aumento da amplitude dos PS (1,42  $\pm$  0,04 vezes) e aumento da duração do IE (1,17  $\pm$  0,03 vezes). Observaram-se diferenças na densidade celular entre os grupos: Controle – Sal NAC (1,59  $\pm$  0,05 vezes), Controle – Pilo NAC (1,44  $\pm$  0,11 vezes); Sal NAC – Pilo Sal (0,59  $\pm$  0,04 vezes); e, Pilo Sal – Pilo NAC (1,53  $\pm$  0,12 vezes). Portanto, a NAC aumentou a densidade celular tanto para o caso de ratos submetidos ao SE (Pilo NAC) quanto para os que não foram submetidos ao SE (Sal NAC).

Os parâmetros propostos por [4] foram adotados para a simulação de referência S1 (Figura 1B), correspondente à simulação do grupo experimental Controle. Na simulação S2, que reproduz o grupo Sal-NAC, o número de células da rede foi aumentado de 1,6 vezes para representar o aumento de densidade celular

causado pela NAC. Porém, como não houve diferenças entre os grupos Controle e Sal-NAC, no modelo, essas células foram admitidas com excitabilidade menor. Portanto, os novos neurônios não foram recrutados durante os eventos simulados e não houve, também, variação dos parâmetros do potencial extracelular.

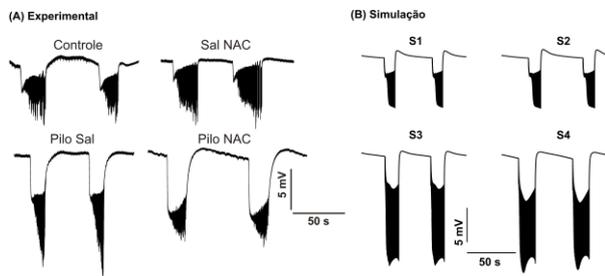


Figura 1 – PE registrado durante a indução de AENS durante experimentos (A) e simulação (B). As simulações foram: (S1) simulação de referência; (S2) aumentando o número de células da rede, porém, com menor excitabilidade; (S3) aumentando os fluxos pelos NKCC e KCC e o volume glial. (S4) combinação das simulações S2 e S3, admitindo que as novas células possam ser recrutadas durante os eventos.

Nos animais tratados com Pilo, em protocolos de indução de epilepsia, observam-se aumento do NKCC, do volume glial e da atividade da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , no período crônico [5,6,7]. Portanto, na simulação S3 (Figura 1B), para representar o grupo Pilo Sal, o fluxo do NKCC foi aumentado em 10 vezes, o volume glial foi aumentado incrementando a osmolaridade intracelular de 15 % e o fluxo da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  foi elevado 30 %. Fazendo essas alterações, no grupo S3, houve aumento da componente DC (1,69x), da amplitude dos PS (2,4x) e da DE (1,2x). A duração do IE reduziu (0,85x).

Para simular o grupo Pilo NAC, na simulação S4 (Figura 1B), o número de células foi aumentado (1,5x) e foi considerado que as novas células apresentam maior excitabilidade, induzida pela Pilo. Nesse caso, quando ocorreram os eventos, os novos neurônios também foram recrutados, contribuindo ativamente para a intensidade da crise. Além disso, foram feitas as mesmas alterações de mecanismos da simulação S3, descrevendo o efeito da pilocarpina no tecido. Em relação à simulação S1, S4 apresentou as seguintes alterações de parâmetros do potencial extracelular: (i) aumento da componente DC (1,75x); (ii) aumento de amplitude dos PS (2,1x) e; (iii) aumento da duração do IE (1,15x) e da DE (1,1x). Comparando os grupos S3 e S4, observa-se que houve aumento da componente DC e da duração do IE, e redução da amplitude dos PS.

Na Figura 2, são comparadas as simulações S1-S4. Analisando os potenciais de Nernst de  $\text{Na}^+$  ( $E_{\text{Na}}$ ),  $\text{K}^+$  ( $E_{\text{K}}$ ) e  $\text{Cl}^-$  ( $E_{\text{Cl}}$ ), ocorreu uma maior positividade do  $E_{\text{Cl}}$ , em relação ao potencial de membrana, nas simulações S3 e, principalmente, S4, durante eventos. Essa alteração foi causada por uma maior redução da  $[\text{Cl}^-]$  extracelular, devido ao influxo de  $\text{Cl}^-$ . O maior influxo de  $\text{Cl}^-$  ocorre em glias, sendo que as glias aumentam sua capacidade de acumular esse ânion por causa do

aumento de volume. O aumento de volume glial também contribuiu para a redução da  $[\text{Cl}^-]$  reduzindo o volume extracelular, pois, para menores valores de volume extracelular, os fluxos transmembranares causaram maiores alterações de concentração iônica. Como pode ser observado, a  $[\text{Cl}^-]$  e o volume neuronais não sofreram alterações significativas entre as simulações S1-S4, assim como as demais concentrações e variáveis do modelo (não apresentadas).

## Discussão

A NAC possui várias ações como uma substância citoprotetora: atividade antioxidante [8], aumento dos níveis de GHS, estimulação de transcrição [9] e favorece a sobrevivência celular [10]. No caso do grupo Sal NAC, não houve alterações das características do potencial extracelular durante as AENS, quando comparado com o grupo Controle. Houve apenas aumento da densidade celular. As simulações sugerem que as novas células do tecido não contribuíram para as AENS, indicando uma menor excitabilidade.

O aumento da densidade celular causado pela NAC foi expressivo, tendo atingido cerca de 25.000 células adicionais, por dia, durante o tratamento com NAC, em todo o GD. Esse aumento está de acordo com relatos de efeitos da NAC promovendo incremento da neurogênese [11] e da sobrevivência celular [10]. Há relatos de que ratos adultos, ainda que sem o tratamento com NAC, podem apresentar um crescimento de 9.000 células/dia, sendo que em ratos em desenvolvimento esse valor pode ser ainda maior, 50.000 células/dia [12].

Segundo as simulações (S3), no grupo Pilo-Sal, os aumentos do DC e da amplitude dos PS foram causados pela redução do volume extracelular, devido ao aumento do volume glial associado com o SE [6]. Um volume extracelular menor proporciona maiores reduções da  $[\text{Cl}^-]$  durante o evento, intensificando o DC [4]. Além disso, por aumentar a resistividade extracelular, o menor volume extracelular amplifica os PS [4]. Além disso, o aumento do fluxo pelo NKCC também contribui para aumentar a componente DC, aumentando o influxo de  $\text{Cl}^-$ , e a maior atividade da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  causa a redução do intervalo entre eventos, aumentando a taxa de recuperação das concentrações iônicas.

Quando os animais foram tratados como Pilo e NAC (grupo Pilo-NAC), a NAC intensificou ainda mais os eventos não-sinápticos. O maior recrutamento neuronal, possibilitado pela maior densidade celular no grupo Pilo NAC em relação ao grupo Pilo Sal (Figura 3) e por um por aumento do nível de excitabilidade neuronal possivelmente causado pelo SE, resulta em redução da  $[\text{Cl}^-]$ , no meio extracelular. Essa redução da  $[\text{Cl}^-]$  aumenta o DC e reduz a amplitude dos PS (pelo bloqueio por despolarização) [4]. Como ocorrem maiores flutuações iônicas e a DE aumenta, o restabelecimento das concentrações iônicas é mais lento após o período ictal e, portanto, o IE fica maior.

Concluindo, os efeitos da NAC observados neste estudo apontam que essa substância, apesar de aumentar

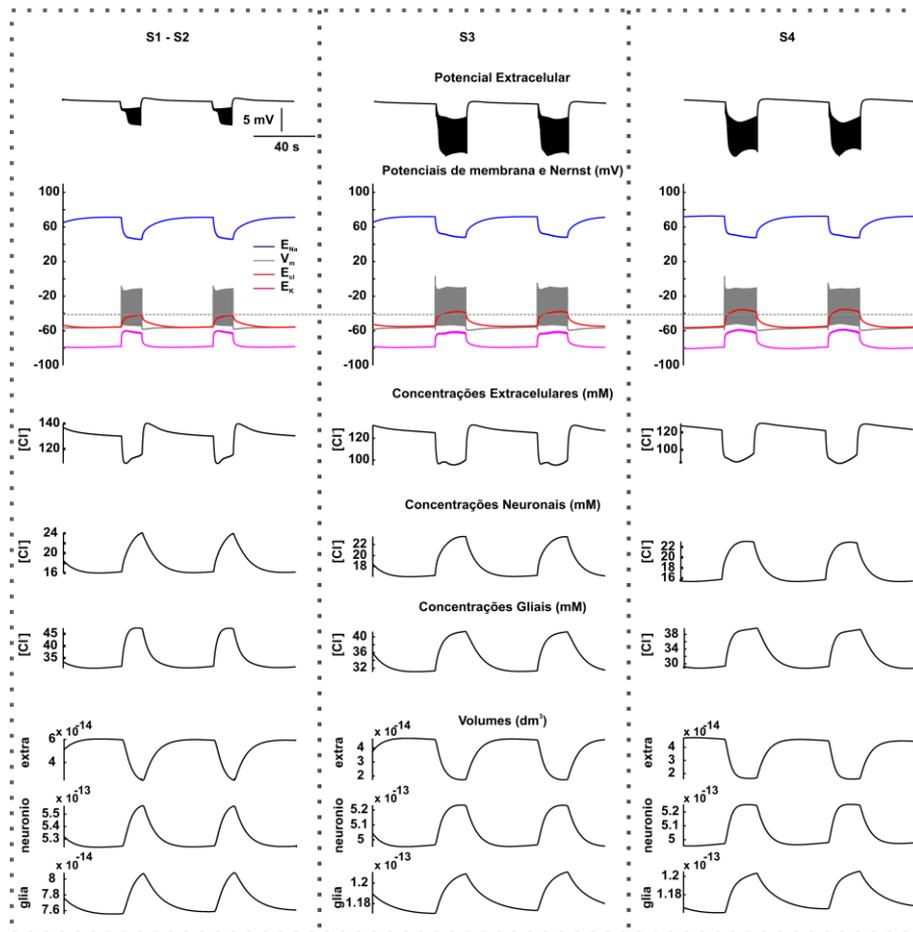


Figura 2 – Detalhamento das principais alterações observadas para as simulações S1-S2, S3 e S4. Os comportamentos das variáveis das simulações S1 e S2 foram semelhantes.

a densidade celular no GD do hipocampo de rato, apenas altera as propriedades de indução de AENS quando o animal é submetido ao *SE*. Segundo as simulações, a NAC intensifica as AENS por possibilitar um maior recrutamento neuronal durante o período ictal.

### Agradecimentos

À FAPEMIG, CNPq, CAPES e FINEP pelo apoio.

### Referências

- [1] Engel Jr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, 2001; 42(6):796-803.
- [2] Hurd RW, Wilder BJ, Helveston WR, Uthman BM. Treatment of four siblings with progressive myoclonus epilepsy of the Unverricht-Lundborg type with N-acetylcysteine. *Neurology*, 1996; 47(5): 1264-8.
- [3] Santos LE, Silveira GA, Costa VD, et al. Alcohol abuse promotes changes in non-synaptic epileptiform activity with concomitant expression changes in cotransporters and glial cells. *PLoS One*, 2013; 8 (11):e78854.
- [4] Almeida ACG, Rodrigues AM, Scorza FA, et al. Mechanistic Hypotheses for nonsynaptic epileptiform activity induction and its transition from the interictal to ictal state – Computational Simulation. *Epilepsia*. 2008; 49(11):1908-24.
- [5] Li X, Zhou J, Chen Z, et al. Long-term expressional changes of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter 1 (NKCC1) and K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> co-transporter 2 (KCC2) in CA1 region of hippocampus following lithium-pilocarpine induced status epilepticus (PISE). *B Res.*, 2008; 1221:141-6.
- [6] Rossi AR, Angelo MF, Villarreal A, et al. Gabapentin administration reduces gliosis and neurodegeneration after pilocarpine-induced *status epilepticus*. *PLoS One*. 2013; 8(11):e78516.
- [7] Fernandes MJS, Naffah MMG, Cavalheiro EA. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity in the rat hippocampus: A study in the pilocarpine model of epilepsy. *Neur Inter*. 1996; 28:497-500.
- [8] Aruoma OJ, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *F R Biol Med*. 1989; 6: 593-7.
- [9] Cotgreave IA. N-Acetylcysteine: pharmacological consideration and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol*. 1997; 38: 205-7.

- [10] Yan CYI, Greene LA. Prevention of PC12 cell death by N-acetylcysteine requires activation of the ras pathway. *J. Neurosci.*, 1998; 18: 4042–9.
- [11] Berk M, Malhi GS, Gray LJ, Dean OM. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Cell*, 2013; 34(3):167-77.
- [12] Cameron HA, McKay RDG. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurology*, 2001; 439:406-17.