

**Padrões de disparo e sincronização em um
modelo para atividades epileptiformes
não-sinápticas**

Danielle Oliveira Costa Santos

Dezembro 2009

Danielle Oliveira Costa Santos

**Padrões de disparo e sincronização em um modelo para
atividades epileptiformes não-sinápticas**

Tese submetida à UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS
GERAIS como requisito parcial para a obtenção do grau de
DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Área de Concentração: FÍSICA

Orientador: Prof. Dr. Ronald Dickman (Departamento de Física/UFMG)

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio-Carlos G. de Almeida (LANEC/UFSJ)

Departamento de Física - ICEx - UFMG

2009

Agradecimentos

Ao Prof. Ronald Dickman, por ter aceitado esta orientação em um tema não-familiar, pelo exemplo de como pensar um problema científico, seja ele no domínio da Física ou Biologia, pelo apoio e gentileza.

Ao Prof. Antônio-Carlos G. de Almeida, pelo aceite da co-orientação, garantindo-me acesso ao Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional (LANEC-UFSJ), permitindo-me trabalhar com o modelo AENS e pelas discussões.

Ao Prof. Antônio Márcio Rodrigues (LANEC-UFSJ), pelas discussões, atenção, gentileza e apoio.

Aos professores e colegas do LANECS-UFSJ, pela atenção, disponibilidade e pelas discussões, especialmente ao Prof. Hewerson Teixeira, Bruno da Silva e Lucélia Pereira.

Aos professores Jerome Baron, Jader Cruz e Ligia Naves Kushmerick, ICB-UFMG, pelas discussões, apoio e incentivo. Agradeço ao Prof. Christopher Kushmerick pelas discussões e importante ajuda durante a minha preparação para o exame de qualificação.

Aos professores e colegas do Departamento de Física (UFMG).

Ao Prof. Jafferson Kamphorst e Antônio Gonçalves por garantirem o funcionamento dos computadores do grupo.

Aos funcionários do Departamento de Física (UFMG), especialmente à Marluce Petinelli, secretária da pós-graduação, e à Shirley Maciel, bibliotecária, pela atenção.

À Banca Examinadora pelas sugestões e colocações.

A Adriano Silva, colaborador e companheiro, pelas incontáveis lições.

A Jacy, Luiz, Marcel e Kleyton, minha família.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

Conteúdo

Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xiii
Resumo	xvi
Abstract	xvii
1 Introdução	1
2 Revisão	5
2.1 Epilepsia	5
2.2 Epilepsia do Lobo Temporal	6
2.3 Hipocampo	7
2.4 Atividades epileptiformes e bases celulares	9
2.5 Conexões não-sinápticas	10
2.6 Modelos para o estudo das epilepsias	18
2.6.1 Modelos animais	18
2.6.2 Modelos computacionais	18
3 Modelo AENS	21
3.1 Arquitetura	21
3.2 Transporte iônico	22
3.2.1 Canais iônicos	23
3.2.2 Bomba- Na^+/K^+	24
3.2.3 Co-transportes	25
3.2.4 Trocadores	25
3.2.5 Sistema de recaptção glial	26
3.3 Indução das atividades epileptiformes	26
3.4 Interações não-sinápticas	29
3.4.1 <i>Gap junctions</i>	29

3.4.2	Efeito de campo elétrico	30
3.4.3	Variação das concentrações iônicas	31
3.5	Descrição matemática	32
3.5.1	Potencial transmembrânico	32
3.5.2	Equação GHK de corrente	33
3.5.3	Concentrações iônicas intra e extracelulares	33
3.5.4	Concentrações e fluxos nas glias	33
3.5.5	Eletrodifusão	34
3.5.6	Potencial extracelular	34
3.5.7	Efeito de campo elétrico	35
3.5.8	Potencial de campo extracelular	35
3.5.9	Concentração do íon fictício gerado pela bomba- Na^+/K^+	36
3.5.10	Fluxo pelo cotransporte KCC	36
3.5.11	Fluxo pelo cotransporte NKCC	37
3.5.12	Fluxos pelos trocadores	37
3.5.13	Volume celular	38
3.5.14	Permeabilidades e variáveis de <i>gating</i> do tipo Hodgkin-Huxley	38
3.6	Implementação do modelo AENS	40
4	Sincronização	45
4.1	Sincronização	45
4.1.1	Sincronização de <i>bursts</i>	47
4.2	Extração de fases	48
4.2.1	Eventos de referência	48
4.2.2	Transformada de Hilbert	49
4.2.3	Transformada de contínua de ondaleta	49
4.3	Quantificando sincronização	54
4.3.1	Medidas clássicas de correlação temporal	54
4.3.2	Coerência de fase média	55
4.3.3	Outras medidas de sincronização: entropia de Shannon e informação mútua	57
4.4	Aplicação	58
5	Gap Junctions	64
5.1	Correntes do acoplamento por <i>gap junctions</i>	65
5.2	Padrões de disparo	66
5.2.1	Períodos do <i>burst</i> e frequências dos potenciais de ação	68
5.3	Sincronização	75
5.4	Discussão	83
5.4.1	O acoplamento por GJs afeta a duração de um <i>burst</i>	83

5.4.2	Modificações das frequências de disparo de potenciais de ação . . .	86
5.4.3	Sincronização	87
6	Concentrações iônicas extracelulares	89
6.1	Padrões de disparo	89
6.2	Sincronização	95
6.3	Discussão	100
6.3.1	Acúmulo de potássio extracelular influencia padrões de disparo . . .	100
6.3.2	Sincronização	102
7	Conclusões e Perspectivas	104
	Referências	115

Lista de Figuras

2.1	Lobo temporal medial e estruturas do sistema límbico.(a) Localização do lobo temporal no córtex cerebral (adaptado de Taupin (2007)). (b) Estruturas do lobo mesial temporal que constituem o sistema límbico, dentre elas a amígdala e o hipocampo (modificado de Morris e Maisto (2001)).	7
2.2	Hipocampo: circuito intrínseco e regiões principais. (a) Esquema do fluxo de informação pelas conexões intrínsecas da formação hipocampal (modificada de (Sweatt, 2003)). (b) Secção da formação hipocampal na qual observamos as regiões GD e CA, representação dos tipos celulares principais (células granulares no GD e piramidais no CA) e das vias que compõem o circuito tri-sináptico. Legendas: ento, córtex entorrinal; sub, subiculum; pp, via perfurante; GD, giro dentado; fim, fimbria; alv, alveus; Sch, colaterais de Schaffer; mf, fibras musgosas (modificado de (O’Keefe e Nadel, 1978)).	8
2.3	Padrões observados durante AEs. (a) Espícula interictal de registro de EEG (acima) e correlatos intracelulares (abaixo; modificado de (Somjen, 2004)). (b) MPD (acima) no qual atuam potenciais pós-sinápticos (EPSPs e IPSPs) e correntes de membrana intrínsecas ($I_{Na(p)}$, I_{Ca} , $I_{K(Ca)}$ e I_{leak} -corrente de sódio persistente, corrente de cálcio, corrente de potássio cálcio-dependente e corrente de vazamento, respectivamente). Abaixo segue o registro do PCE no qual o desvio da linha de base é proeminente (modificado de (Bazhenov et al., 2008)). (c) PCEs (acima) e <i>bursts</i> epileptiformes intracelulares (abaixo) registrados em células piramidais do CA1 durante crises induzidas pela elevação da concentração de potássio extracelular (extraído de (Somjen, 2004)).	11
2.4	Esquema da conexão por GJs no qual se destacam os poros formados pelas proteínas conexas, cada qual formada pelo arranjo de seis pares de conexons.Modificado de (Purves et al., 2004).	13
2.5	Exemplo de interações efápticas entre axônios gigantes de lula (extraído de (Jefferys, 1995)).	14

2.6	Correntes iônicas lançadas ao meio extracelular, a partir do axônio do neurônio esquemático, devido à propagação de um PA. Essas correntes iônicas extracelulares geram os campos elétricos os quais alteram os potenciais de membrana de neurônios da vizinhança. Modificado de (da Silva, 2002)	14
2.7	Variação do PT com $[K^+]_o$ (em células do glânglio dorsal de ratos). Cada ponto representa a média com o desvio padrão. As abscissas foram expressas numa escala logarítmica. Concentrações acima de 10mM aproximam o PT do potencial de Nernst do potássio (linha reta). Adaptado de (Somjen, 2004).	16
2.8	Modelos animais e computacionais classificados de acordo com o nível hierárquico da estrutura objeto da investigação. Os modelos computacionais, também são classificados quanto ao nível de detalhamento, podendo ser detalhados ou agrupados. Modificado de (Wendling, 2008).	20
3.1	Arquitetura do modelo. (a) Camada granular do GD numa fatia de hipocampo de ratos é representada por uma estrutura tridimensional. (b) Soma de uma célula granular (em azul) e de glia (em vermelho). (c) Representação geométrica de (b) constituindo uma unidade funcional. (d) O conjunto de unidades funcionais forma uma rede cúbica. Reproduzido de (Almeida et al., 2008).	22
3.2	Representação da perfusão no modelo AENS. Em (a) uma camada extra de compartimentos cerca a rede cúbica, contendo somente íons cujas concentrações são fixas. Uma das faces da rede cúbica não recebe a camada extra para representar a interface líquido-gás sobre a fatia. (b) foi adaptado de (Hrabitová e Nicholson, 2007).	23
3.3	Esquema dos mecanismos de transporte iônico em uma unidade funcional, os quais compreendem canais iônicos, bomba- Na^+/K^+ , trocadores, cotransportadores cátion-cloreto e GJs. O sistema de recaptção glial, que se apresenta com vários transportadores iônicos nas membranas das glias, controla as CIs extracelulares. Reproduzido de (Almeida et al., 2008).	24

3.4	Diagrama esquemático dos mecanismos atuantes durante as fases do <i>burst</i> epileptiforme. Na fase (I) há deflagração de um <i>burst</i> ou a transição da fase interictal (ou fase silenciosa) para a fase ictal (ou fase ativa). (II) corresponde ao período ictal no qual há o disparo de uma seqüência de potenciais de ação induzido pela despolarização neuronal provocada pelo aumento de $[Cl^-]_i$. (III) sinaliza o término da fase ativa marcada pelo efluxo de Na^+ devido à bomba- Na^+/K^+ , superando o influxo de Na^+ via canais iônicos. Em (IV) segue o período inter-ictal, quando há a recuperação dos gradientes iônicos, repolarização neuronal e decréscimo da atividade da bomba- Na^+/K^+	27
3.5	Potenciais transmembrânicos simulados (a) e registro experimental (b; extraído de (Pan e Stringer, 1997)).	28
3.6	Potenciais de campo extracelulares simulados (a) e registro experimental (b; extraído de (Rodrigues, 2003)).	29
3.7	Diagrama esquemático das escalas de tempo nas quais operam os mecanismos de comunicação neural, sejam sinápticos ou não-sinápticos. Cada traço representa o intervalo entre o menor tempo de latência e o maior tempo de duração para os efeitos sobre <i>population spikes</i> observados experimentalmente (modificado de (Rodrigues, 2003)).	30
3.8	Esquema representando a ordem de execução dos cálculos na simulação do modelo AENS.	43
4.1	Regimes de sincronização associados ao <i>bursting</i> (modificado de (Izhikevich, 2007)).	47
4.2	Função $s(t) = \cos(\omega t) + \cos(3\omega t) + \cos(5\omega t)$ (a) e trajetórias no plano complexo obtidas com o cálculo da transformada de Hilbert (b,c). Observe os múltiplos centros de rotação em (b), o que torna a definição de fase não unívoca. Em (c) filtramos o sinal, isolando uma das freqüências, restando um único centro de rotação. Neste caso o conceito de fase não é ambíguo.	50
4.3	(a) Função $\cos(\omega t)$ (linha cheia) e sua transformada de Hilbert (linha tracejada). (b) A trajetória no plano complexo.	51
4.4	Dilatação e compressão das partes real e imaginária de uma ondaleta-mãe, a função de Morlet (Ψ). (esquerda: $a = 0,5$; direita: $a = 5,0$).	52
4.5	Oscilações do modelo AENS (esquerda) e formas da função completa de Morlet (direita). (a) Oscilações lentas do burst e função de Morlet com $n_c = 6$. (b) Potenciais de ação e função de Morlet com $n_c = 1$	54

4.6	Representação no círculo unitário das fases do primeiro oscilador (pontos em vermelho) em vários instantes de tempo, mantendo-se a fase do segundo oscilador fixa. Representa-se a CFM vetor no centro do círculo. Quando o par entra em um regime de sincronização, as fases do primeiro oscilador tendem a se concentrar. Isto significa que se estabeleceu uma relação temporal estável entre as fases de cada oscilador (adaptado de (Pikovsky et al., 2001; Rosenblum et al., 2001)).	56
4.7	Distribuição da fase relativa de um par de osciladores em um regime não sincronizado (a) e de sincronização (b). Em (a) a distribuição da fase relativa é uniforme. Quando o par entra em um regime de sincronização a distribuição é concentrada.	56
4.8	Representação da rede de neurônios do modelo $I_{Na,p}+I_K+I_{K(M)}$ conectados por <i>gap junctions</i> representadas pelos resistores.	58
4.9	Potenciais transmembrânicos dos neurônios da rede quadrada (N=9). Em (a) $g_{gj}=0$ e em (b) $g_{gj}=2,0\text{mS/cm}^2$	60
4.10	Espectro de potências dos potenciais de membrana do modelo para três valores da condutância das <i>gap junctions</i> ($g_{gj}=0,0$ (A); 0,4(B) e 1,0 (C) em mS/cm^2).	61
4.11	Fases extraídas dos potenciais transmembrânicos após filtragem e uso da transformada de Hilbert. Em (a) e (b) aplicamos um filtro passa-baixa com frequência de corte em 0,1 Hz. Em (c) e (d) utilizamos um filtro passa-faixa centrado em 1,0 Hz (com largura $\pm 0,1$ Hz). À esquerda $g_{gj}=0$ e à direita, $g_{gj}=2,0 \text{ mS/cm}^2$	62
4.12	Fases representadas no plano complexo correspondentes às oscilações lentas (a) e rápidas (b).	62
4.13	CFM em função da constante de acoplamento por GJs. A curva em vermelho ilustra o crescimento dos níveis de sincronização entre oscilações lentas e a curva em preto entre potenciais de ação.	63
5.1	Variações das CIs intra e extracelulares do íons sódio, potássio e cloreto, no modelo AENS, em uma unidade funcional no centro da rede com $N = 125$. Fixamos o valor do acoplamento por GJs, $k_{GJ} = 1,25$ a tortuosidade do extracelular em 1,6. As condições iniciais para essas variáveis são (em mM): $[\text{Na}^+]_i = 10$; $[\text{Na}^+]_o = 131$; $[\text{K}^+]_i = 130$; $[\text{K}^+]_o = 4,0$; $[\text{Cl}^-]_i = 9,0$; $[\text{Cl}^-]_o = 130$	66
5.2	PTs, correntes pelas GJS descritas pela equação de GHK e Lei de Ohm (linhas tracejadas e grossas). $N = 45$, $k_{GJ} = 0,25$ (preto); 0,50 (vermelho); 1,25(azul), $\lambda = 1,6$ (esquerda) and 3,0 (direita). As correntes são iguais se $k_{GJ} \geq 1,25$ e $\lambda \geq 3,0$ (f).	67

5.3	PTs de um neurônio típico da rede com $N = 45$ unidades funcionais e três valores do acoplamento por GJs: $k_{GJ} = 0; 1,25; 2,0$. O conjunto de condições aleatórias sobre condições iniciais e permeabilidades é o mesmo em (a)-(c). Os gráficos ilustram um período do <i>bursting</i> com destaque para a fase ativa. Observa-se uma tendência ao aumento da duração da fase ativa elevando-se o valor de k_{GJ} ou da tortuosidade de 1,6 (a) para 4,0(b). Em (c) o detalhe do início de uma fase ativa mostra uma seqüência de PAs caminhando sobre a linha de base despolarizada ($\lambda = 1,6$ e $k_{GJ} = 1,25$).	69
5.4	<i>Bursts</i> nos PTs de um neurônio típico da rede com $N = 125$ unidades funcionais para $k_{GJ} = 0; 1,25; 2,0$ e $\lambda = 1,6$ (a) e 4,0 (b). Utilizamos o mesmo conjunto de condições aleatórias sobre condições iniciais e permeabilidades da figura 5.1. Observa-se, como na figura 5.3, uma tendência ao aumento da duração da fase ativa elevando-se k_{GJ} . A redução da amplitude dos PAs, no início do <i>burst</i> , torna-se dramática com o crescimento da tortuosidade (b). Em (c) temos um detalhamento do início da fase ativa para $k_{GJ} = 2,0$ e $\lambda = 4,0$. As amplitudes reduzidas não ultrapassam 2,0 mV.	70
5.5	$\langle T_{burst} \rangle$ e $\langle f_{spike} \rangle$ ($N = 45$) em função do acoplamento por GJs do neurônio central (A,B) e dois outros escolhidos aleatoriamente, próximos às fronteiras com a solução de perfusão (c),(d) e interface gás-líquido (e),(f). Fixamos as tortuosidades em $\lambda = 1,6$ (círculos); 2,0 (diamantes); 3,0 (triângulos) e 4,0 (quadrados). Em (a),(c) e (e) não observamos diferenças qualitativas entre $\langle T_{burst} \rangle$; os períodos crescem com os valores de k_{GJ} e de λ . Há pontos de mínimo em torno do valor $k_{GJ} = 0,25$. Nos gráficos de $\langle f_{spike} \rangle$, (b), (d) e (f), observamos um máximo na frequência que se desloca com o valor de tortuosidade e difere a depender da posição do neurônio na rede. Não há diferenças qualitativas significativas. As grandezas são expressas como $\langle \text{média} \rangle \pm$ erro padrão. Em algumas curvas as barras de erro são menores do que os símbolos.	71
5.6	$\langle T_{burst} \rangle$ (a) e $\langle f_{spike} \rangle$ (b) versus k_{GJ} para $\lambda = 2,0$ e três tamanhos de rede ($N = 27$ (círculos), 45 (triângulos), 125 (quadrados)). As curvas são qualitativamente semelhantes aos gráficos da figura 5.5.	72
5.7	Representação em escala de cinzas das modificações de $\langle T_{burst} \rangle$ no espaço de parâmetros formado por k_{GJ} e λ . $\langle T_{burst} \rangle$ assume os valores mais elevados nas regiões $\lambda > 3,0$ e $k_{GJ} > 0,25$ ($N = 27$), $k_{GJ} > 0,5$ ($N = 45$) e $k_{GJ} > 1,0$ ($N = 125$).	73

5.8	Representação em escala de cinzas das modificações de $\langle f_{spike} \rangle$ no espaço de parâmetros formado por k_{GJ} e λ . Para $N = 27$ e 45 , $\langle f_{spike} \rangle$ exibem valores mais elevados nas regiões $0,25 < k_{GJ} < 1,25$ e $\lambda < 2,5$. Para $N = 125$, a região é menor ($\lambda < 2,0$) e há uma segunda região, tendo o mesmo intervalo de k_{GJ} e $\lambda > 3,5$	74
5.9	Cruzamento das densidades de fluxos de Na^+ pelos canais iônicos dependentes de voltagem (linhas sólidas) e a bomba- Na^+/K^+ (linhas tracejadas) do neurônio central ($N = 45$). Cada cruzamento marca uma transição para o período silencioso, correspondente a um valor de k_{GJ} . Os cruzamentos são unidos por uma linha de tendência (em vermelho). Em (a) $\lambda = 2,0$ e em (b) $\lambda = 3,0$	76
5.10	Mudanças no tempo de disparo de PAs em um par típico de neurônios acoplados ($N = 45$, $\lambda = 1,6$ e $k_{GJ} = 0$ (a); $0,25$ (b); $0,50$ (c); $0,75$ (d); $1,25$ (e) e $2,0$ (f)). O aumento gradual da força de acoplamento por GJs primeiro induz despolarizações de pequenas amplitudes, no neurônio menos despolarizado (em vermelho); segundo, induz o disparo de PAs e terceiro, estabelece sincronização entre PAs. O aumento do número de <i>spikes</i> em um <i>burst</i> do segundo neurônio provoca a variação de $\langle f_{spike} \rangle$. As escalas verticais são as mesmas em todas as figuras.	77
5.11	Espectro de potências dos PTs simulados ($N = 27$ e $\lambda = 3,0$). Em (a),(b) $k_{GJ} = 0$ e em (c), (d) $k_{GJ} = 1,25$. Esses padrões são semelhantes para todos os demais parâmetros.	79
5.12	Representação no plano complexo do PT de um neurônio típico. Em (a)-(c) $N = 45$ e $\lambda = 2,0$. Em (d)-(f) $N = 125$ e $\lambda = 1,6$. (a) e (d) ilustram cerca de três ciclos do PT não filtrado. (b) e (e) trazem também três ciclos nos quais aplicamos o filtro passa-baixa do tipo FIR com preservação das fases e corte em 1 Hz. Em (c) e (f) uma seqüência de PAs em um <i>burst</i> foi tratada usando o filtro passa-faixa do mesmo tipo centrado em 52 ± 2 Hz. Aplicando o filtro passa-baixa ou passa-faixa os centros de rotação se tornam definidos.	80
5.13	CFM do par central (esquerda) e par na fronteira (direita). As tortuosidades têm os valores $\lambda = 1,6$ (círculos); $2,0$ (diamantes); $3,0$ (triângulos); $4,0$ (quadrados) e $N = 45$.(a) e (b) CFM em baixa freqüência.(c) e (d) CFM em alta freqüência. Em algumas curvas as barras de erro são menores do que os símbolos.	81
5.14	CFM do par central calculado para três tamanhos de rede: $N = 27$ (círculos), 45 (triângulos), 125 (quadrado) e $\lambda = 2,0$. (a) CFM em baixa freqüência. (b) CFM em alta freqüência.	82

5.15	Simulação dos PCEs, medidos no compartimento central, para $N = 45$ e $\lambda = 1,6$. Em (a) de cima para baixo: $k_{GJ} = 0; 1,25; 2,0$.(b) PAs (acima) e <i>population spikes</i> (abaixo). $k_{GJ} = 2,0$	83
5.16	Representação da CFM em baixa frequência no espaço de parâmetros formado por k_{GJ} e λ . A CFM em baixa frequência exhibe valores elevados em quase todo o espaço de parâmetros, exceto para $k_{GJ} < 0,25$ ($N = 27$ e 45). Para $N = 125$, há duas regiões onde a CFM é superior.	84
5.17	CFM em alta frequência representada no espaço de parâmetros formado por k_{GJ} e λ .As regiões correspondentes aos valores mais elevados da CFM em alta frequência tendem a se concentrar quando aumentamos o tamanho da rede, para $N = 27$ e 45 . A figura 5.17(c), na qual $N = 125$, o padrão difere dos anteriores, destacando-se duas regiões onde a sincronização é maior no intervalo $k_{GJ} > 1,0$	85
6.1	PTs de neurônios típicos modificados pela tortuosidade e tamanho da rede (um ciclo completo). $\lambda = 1,6; 2,0$ e $4,0$ e $N = 27$ (a), 45 (b) e 125 (c), (d). Em (d), no detalhamento do início da fase ativa do terceiro <i>burst</i> de (c) – da esquerda para a direita – observamos a interrupção do disparo de PAs.	91
6.2	$\langle T_{burst} \rangle$ e $\langle f_{spike} \rangle$ variam com N e λ . Escolhemos três neurônios, o primeiro no centro (a), (b) e os demais em localizações aleatórias próximas aos planos de fronteira com a perfusão (c), (d) e com a interface gás-líquido (e),(f). $N = 27$ (círculos), $N = 45$ (triângulos), $N = 125$ (quadrados). As curvas apontam crescimento monotônico de $\langle T_{burst} \rangle$ e $\langle f_{spike} \rangle$, exceto no centro da rede, onde há um decaimento para $\lambda > 3,0$ e $N = 125$ em $\langle T_{burst} \rangle$ e $\lambda > 2,4$ em $\langle f_{spike} \rangle$. As grandezas são expressas como $\langle \text{média} \rangle \pm$ erro padrão. As barras de erro são menores do que os símbolos.	92
6.3	Cruzamento das densidades de fluxo de sódio via canais iônicos (linhas cheias) e Na^+/K^+ -ATPase (linhas tracejadas) no neurônio central. $N = 27$ (a), 45 (b), 125 (c). Os pares de curvas, com a mesma cor, correspondem aos valores de $\lambda = 1,5; 1,6; 2,0; 3,0$ e $4,0$. Os pontos de cruzamento (círculos vermelhos) são unidos por uma linha de tendência (em vermelho).	93
6.4	Concentrações extracelulares de potássio do neurônio central em função do tempo para $N = 27$ (preto), 45 (azul), 125 (vermelho). $\lambda = 1,6$ (a), $2,0$ (b) e $4,0$ (c).	94
6.5	Representação de $\langle T_{burst} \rangle$ (6.5(a)) e $\langle f_{spike} \rangle$ (6.5(b)) no espaço de parâmetros formado por λ e N	96
6.6	Espectro de potências dos PTs simulados para $N = 125$ e $\lambda = 1,6$. Em (a),(b) $k_{GJ} = 0$ e em (c), (d) $k_{GJ} = 2,0$. Esses padrões são semelhantes quando mudamos todos os demais parâmetros.	97

6.7	CFM versus λ para três tamanhos de rede: $N = 27$ (círculos), 45 (triângulos) e 125 (quadrados). Os gráficos (a) e (b) correspondem a um par situado no centro da rede; (c) e (d) representam um par próximo a um plano de fronteira. A CFM em baixa frequência acusa valores acima de 90% em (a) e (c), mas há uma tendência de queda para $\lambda > 2,0$. A CFM em alta frequência indica sincronização baixa entre PAs e crescimento da sincronização com a tortuosidade no par central.	98
6.8	Potenciais de ação no início da fase ativa do <i>burst</i> de um par acoplado localizado no centro da rede ($N = 125$) para $\lambda = 1,6$ (a); 2,0 (b) e 4,0 (c). O aumento da tortuosidade, sem a presença de acoplamento eletrotônico não é suficiente para induzir despolarizações de baixa amplitude no neurônio mais hiperpolarizado ((a) e (b) em vermelho e preto em (c)); além disso, não há sincronização de PAs (veja figura 5.10,página 77).	99
6.9	Simulação dos potenciais de campo extracelulares, medidos no compartimento central, para $\lambda = 1,6$ e $N = 27$ (acima), 45 (meio), 125 (abaixo). . .	100
6.10	CFM em baixa (6.10(a)) e em alta frequência (6.10(b)) no espaço de parâmetros formado por λ e N	101

Lista de Tabelas

3.1	Constantes	40
3.2	Permeabilidades iônicas	40
3.3	Parâmetros relacionados aos cotransportes, trocadores e bomba- Na^+/K^+	41
3.4	Demais parâmetros do modelo AENS	42
3.5	Parâmetros de inicialização	44

Lista de Abreviaturas e Símbolos

<i>AE</i>	Atividade epileptiforme
<i>AENS</i>	Atividades epileptiformes não-sinápticas
<i>CA</i>	Corno de Amon
<i>CFM</i>	Coerência de fase média
<i>CI</i>	Concentração iônica
<i>EEG</i>	Eletroencefalograma
<i>EPSP</i>	Potencial pós-sináptico excitatório (do inglês <i>Excitatory postsynaptic potential</i>)
<i>ELT</i>	epilepsia do lobo temporal
<i>GD</i>	Giro dentado
<i>GHK</i>	Goldman-Hodgkin-Katz
<i>GJ</i>	<i>Gap junction</i> ou <i>gap junctional</i>
<i>IPSP</i>	Potencial pós-sináptico inibitório (do inglês <i>Inhibitory postsynaptic potential</i>)
<i>KCC</i>	Cotransporte potássio-cloreto
<i>NKCC</i>	Cotransporte sódio-potássio-cloreto
k_{GJ}	Constante do acoplamento por <i>gap junctions</i>
λ	Tortuosidade
<i>ME</i>	Meio extracelular
<i>MI</i>	Meio intracelular
<i>MNS</i>	Mecanismo não-sináptico
<i>N</i>	Número de unidades funcionais no modelo AENS

PA	Potencial de ação
PCE	Potencial de campo extracelular
MPD	Mudança paroxística da despolarização (tradução do inglês <i>paroxysmal depolarizing shift</i>)
PT	Potencial transmembrânico
$\langle T_{burst} \rangle$	Período médio de um <i>burst</i> calculado sobre a desordem
$\langle f_{spike} \rangle$	Média sobre desordem das frequências de potenciais de ação em um <i>burst</i>
Ca^{2+}	Íon cálcio
Cl^{-}	Íon cloreto
K^{+}	Íon potássio
K_o^{+}	Potássio extracelular
K_i^{+}	Potássio intracelular
Na^{+}	Íon sódio

Resumo

Atividades epileptiformes (AEs) se caracterizam pela hiperexcitabilidade e sincronização entre descargas neuronais. No início dos anos 80, demonstrou-se que é possível induzir AEs em ambientes onde a concentração de cálcio extracelular é reduzida a ponto de bloquear a transmissão por sinapses químicas. Desta forma, os mecanismos não-sinápticos (MNSs) seriam responsáveis pela geração e sustentação das AEs nessas condições. MNSs têm como exemplos o acoplamento por *gap junctions* (GJs) e as variações das concentrações iônicas (CIs) intra e extracelulares. Durante as AEs, as CIs variam intensamente, especialmente a concentração de potássio extracelular ($[K^+]_o$). O aumento de $[K^+]_o$, devido aos intensos disparos neuronais, ativa uma série de processos afetando as AEs. Uma questão importante é se a variação de $[K^+]_o$ também atua sobre a interação por GJs. Para examinar como o acoplamento por GJs, modulado pela dinâmica das CIs extracelulares influencia os padrões de disparo e sincronização utilizamos a versão modificada de um modelo, desenvolvido por Almeida e colaboradores, que simula AEs não-sinápticas *in vitro*. O modelo usa uma rede de compartimentos para representar a camada granular do giro dentado do hipocampo de ratos, com AEs induzidas pelo protocolo alto- K^+ e zero- Ca^{2+} . A corrente por GJs depende das CIs intracelulares dos neurônios conectados, ao contrário da abordagem tradicional, a qual trata GJs como resistores ôhmicos. Modulamos as CIs extracelulares usando a tortuosidade do meio extracelular e o número de compartimentos do modelo. Variamos a intensidade do acoplamento por GJs, sob valores distintos de tortuosidade, estudando as alterações nos disparos e na sincronização dos potenciais transmembrânicos. Também estudamos o caso de interação nula por GJs, avaliando como o acoplamento pelas CIs extracelulares, isoladamente, altera as descargas neuronais e as correlações temporais. As simulações sugerem que as variações de $[K^+]_o$ modula a interação por GJs, modificando frequências de disparo e níveis de sincronização. Eliminando a interação por GJs, a alteração das frequências de disparo e dos índices de sincronização permanece, principalmente entre oscilações lentas.

Palavras-chave: Epilepsia, Sincronização, Conexões Não-sinápticas, *Gap Junctions*, Tortuosidade, Espaço Extracelular, Modelo Computacional.

Abstract

Epileptiform activities (EAs) are characterized by hyperexcitability and high synchronism between neuronal discharges. In the early 1980s it was shown that it is possible to induce EAs in media where the extracellular calcium concentration is reduced to levels such that chemical synaptic transmission is blocked. Evidently, nonsynaptic mechanisms (NSMs) are responsible for generation and maintenance of EAs in these conditions. Examples of nonsynaptic mechanisms are coupling through gap junctions (GJs) and the variation of intra and extracellular ionic concentrations. During EAs, there is intense variation of ionic concentrations, especially that of extracellular potassium ($[K^+]_o$). The increase of $[K^+]_o$, caused by intense neuronal discharge, activates several processes, which subsequently affect EAs. We investigate whether the extracellular ionic concentration variation, principally of $[K^+]_o$ also influence the coupling through GJs. To examine how the GJ coupling, modulated by extracellular ionic concentration variation, affects discharge and synchronization patterns, we use a modified version of a model, introduced by Almeida et al., which simulates *in vitro* nonsynaptic EAs. The model represents the granular layer of the rat dentate gyrus as a cubic array. EAs are induced under high- K^+ and zero- Ca^{2+} conditions. The current through GJs is dependent on intracellular ionic concentrations, different from the usual approach, which treat GJs as ohmic resistors. We modulate the extracellular ionic concentrations varying the tortuosity of the extracellular medium and the number of functional units in the model. We modify the GJ coupling strength, under distinct tortuosity values, to study neuronal firing and synchronization modifications. We also study the case of null GJ coupling, to examine how the interaction through extracellular ionic concentrations, in isolation, alters firing and temporal correlations. Our results suggest that the extracellular ionic concentrations, especially $[K^+]_o$, modulates the GJ coupling, modifying firing frequencies and synchronization levels. When the GJ coupling is eliminated, we observe variations in the firing frequencies and synchronization levels, most between slow oscillations.

Keywords: Epilepsy, Synchronization, Nonsynaptic Coupling, Gap Junctions, Tortuosity, Extracellular Space, Computational Model.

Capítulo 1

Introdução

Sincronização e hiperexcitabilidade neuronal são elementos críticos para deflagrar e sustentar crises epiléticas. Hiperexcitabilidade é a predisposição excessiva para o disparo de potenciais de ação (PAs). Ela pode ser induzida pela estimulação elétrica repetitiva ou pelo desequilíbrio entre excitação e inibição sinápticas. A alteração dos mecanismos de controle das concentrações iônicas (CIs) também conduz ao aumento de excitabilidade. Por exemplo, um desequilíbrio na recaptação de potássio extracelular, K_o^+ , provoca elevação da excitabilidade (Gorji et al., 2006). Isto acontece porque o aumento da concentração de potássio extracelular ($[K^+]_o$), acima de 5 mM desloca o potencial de repouso em direção ao limiar para disparo de um PA. O aumento de $[K^+]_o$ corresponde a um deslocamento do potencial de Nernst, dependente da razão $[K^+]_o/[K^+]_i$ (Somjen, 2004).

O excesso de $[K^+]_o$ não é considerado uma causa primária para crises epiléticas. Entretanto, observa-se, nos registros de crises *in vivo* e *in vitro* o aumento da concentração desse íon devido às intensas atividades neuronais (Konnerth et al., 1986; Yaari et al., 1986). A elevação de $[K^+]_o$ induz um processo de retro-alimentação positiva (ou seja, um ciclo de reforço do aumento de $[K^+]_o$), o qual ativa mecanismos responsáveis pela manutenção de crises auto-sustentadas (Fröhlich et al., 2008a). Uma consequência interessante desse fenômeno é a remoção de cálcio extracelular (Ca_o^{2+}), intensificando o aumento de excitabilidade pela redução do efeito de blindagem eletrostática superficial (Hille, 2001). Outro efeito importante do decréscimo de Ca_o^{2+} é o bloqueio da transmissão sináptica (Somjen, 2004).

No princípio dos anos oitenta, demonstrou-se que é possível induzir atividades epileptiformes¹ (AEs) em fatias *in vitro* eliminando-se Ca^{2+} da solução de banho (Jefferys e Haas, 1982; Konnerth et al., 1984; Taylor e Dudek, 1982). Mais tarde, foram registradas AEs *in vivo*, nas quais os níveis de Ca_o^{2+} se reduziram o suficiente para o bloqueio das transmissões sinápticas (em média de 1,0 mM para 0,1 mM; (Pumain et al., 1985)). Tais

¹Atividades epileptiformes são os padrões de atividade elétrica produzidos no córtex típicos do tecido epilético ou em processo epileptogênico (em transição para o estado de crises recorrentes não provocadas) (Somjen, 2004).

experimentos levaram à hipótese de interações não-sinápticas como responsáveis pelas AEs, ou seja, pela hiperexcitabilidade e sincronização.

O termo “não-sináptico” se refere à independência de comunicação interneuronal por sinapses químicas ativas, ou seja, independência das vias de transmissão onde haja liberação de neurotransmissores em uma estrutura especializada, a fenda sináptica (Alger, 2002; Jefferys, 1995). Há evidências da importância dos mecanismos não-sinápticos para a geração de AEs mesmo a concentrações normais de Ca_o^{2+} (Bikson et al., 2002; Xiong e Stringer, 2001). Os mecanismos não-sinápticos abordados neste trabalho são o acoplamento por *gap junctions* (GJs)² e as variações das CIs extracelulares (Jefferys, 1995) (considerando nulo o efeito de campo). Os acoplamentos por GJs induzem sincronização, sendo também capazes de modular descargas neuronais (Hormuzdi et al., 2004; Perez-Velazquez e Carlen, 2000). Investigações teóricas (Kepler et al., 1990; Postnov et al., 2006; Sherman e Rinzel, 1991, 1992) e experimentais (Perez-Velazquez et al., 2001, 1994) assumem que GJs funcionam como resistores ôhmicos. Esta aproximação é válida quando as variações das CIs são negligenciáveis. Contudo, há variações intensas das CIs durante as atividades epileptiformes, devido ao desequilíbrio do funcionamento de mecanismos de transporte reguladores dessas concentrações. Por exemplo, o descontrole das funções dos cotransportes NKCC e KCC pode causar o acúmulo de cloreto intracelular (Dzhala et al., 2005; Fukuda, 2005; Koninck, 2007). Deste modo, é preciso examinar de que forma as variações das CIs afetam as correntes que fluem por GJs e, conseqüentemente, os padrões de disparo e de sincronização. Neste trabalho, assumimos que variações extremas de $[\text{K}^+]_o$, desregulam tais mecanismos de transporte, levando invariavelmente às alterações das CIs intracelulares.

A eletrodifusão governa as variações das CIs extracelulares (Syková e Nicholson, 2008). Ela pode ser modulada alterando-se, por exemplo, a fração de volume celular e a tortuosidade, características estruturais do espaço extracelular. Tortuosidade representa um impedimento à difusão pela presença de obstruções celulares, aprisionamento de íons em micro-espacos, interações com outras espécies químicas e viscosidade não-homogênea. A tortuosidade, portanto, é um parâmetro que representa todos os fatores os quais reduzem a livre difusão (Syková, 2004). Logo, podemos defini-la através de uma relação entre os coeficientes de difusão livre e efetiva (Syková e Nicholson, 2008).

Estudos experimentais e teóricos de atividades epileptiformes não-sinápticas (AENS) são conduzidos, em sua maioria, no hipocampo, porque essa estrutura é propícia à geração de AEs. A distribuição celular, altamente organizada em lâminas promove o espalhamento de atividade sincronizada e a geração de potenciais de campo extracelulares intensos. Há várias propostas sugerindo que o giro dentado (GD) funciona como um portão ou filtro para a entrada de informações para o hipocampo. O motivo é a resistência dessa região a

²Neste texto utilizamos o termo *gap junctions* para designar junções comunicantes (Kandel et al., 2003).

um descontrole de excitabilidade, devido, por exemplo, ao limiar elevado de excitabilidade das células granulares, em relação aos tipos celulares principais das demais regiões do hipocampo. Sendo assim, o GD bloquearia o fluxo de AE para o hipocampo (Dudek e Sutula, 2007).

Todavia, as células granulares do GD são conectadas por GJs (MacVicar e Dudek, 1982). Além disso, o denso empacotamento dessas células facilita interações por efeito de campo e pela modificação do acúmulo iônico por eletrodifusão. Como consequência, quando submetida ao aumento de $[K^+]_o$ essa área perde seu papel protetor, exibindo descargas epileptiformes que eventualmente se espalham para as demais regiões hipocámpais (Schweitzer et al., 1992).

Nesta tese investigamos os padrões de disparo e de sincronização utilizando um modelo para a geração e sustentação de AE. O modelo, uma modificação da versão introduzida por Almeida e colaboradores (Almeida et al., 2008), simula os padrões de AEs no GD em fatias do hipocampo de ratos, *in vitro*, sob o protocolo alto- K^+ e zero- Ca^{2+} . Ele permite explorar a intensidade do acoplamento por GJs, sob grandes alterações das CIs intra e extracelulares. Também possibilita estudar as modificações no acúmulo de íons no espaço extracelular, especialmente K_o^+ , alterando a tortuosidade do meio ou o total de unidades funcionais do modelo, que modifica a quantidade de íons liberados para o espaço extracelular.

Revisamos, no capítulo 2, os aspectos mais importantes sobre epilepsia, com destaque para a epilepsia do lobo temporal, que acomete o hipocampo. Abordaremos as principais manifestações clínicas, estruturas corticais envolvidas e os mecanismos celulares determinantes para a gênese de AEs, incluindo os mecanismos não-sinápticos. Discutiremos ainda a importância da utilização de modelos teóricos para elucidar os processos envolvidos no surgimento e sustentação de crises. No capítulo 3 descrevemos o modelo AENS, incluindo todo o conjunto de equações e parâmetros utilizados na simulação.

Analizamos potenciais transmembrânicos (PTs), potenciais de campo extracelulares (PCEs)³, concentrações e fluxos simulados pelo modelo, medindo as mudanças no padrão de atividade por meio da inspeção qualitativa dessas grandezas e pelo cálculo das frequências médias de disparo. A análise de sincronização usa o conceito de sincronização de fase entre pares de PTs (Rosenblum et al., 2001). Esta análise possibilita estudar separadamente as diversas frequências de disparo, ou seja, a sincronização entre oscilações lentas e entre PAs no *bursting*⁴ (Izhikevich, 2007). Faremos uma breve revisão dos conceitos de sincronização no capítulo 4. Utilizamos a coerência de fase média, uma grandeza bem estabelecida, para a medida de sincronização de fase entre osciladores auto-sustentados, uma característica dos neurônios do modelo quando submetidos a $[K^+]_o$ elevada. Além da coerência de fase média, os índices baseados na teoria de informação têm sido utilizados

³Usamos a designação "potencial de campo" para traduzir o termo *field potential* (Kandel et al., 2003).

⁴O termo *burst* pode ser traduzido como salva (de potenciais de ação) (Kandel et al., 2003).

para analisar distribuições de probabilidade de sistemas não-lineares, caracterizando regimes de sincronização. Nesses regimes, as distribuições de probabilidade das fases relativas tendem a se concentrar; no caso oposto, de dessincronização, as distribuições tendem à uniformidade.

No capítulo 5 analisamos a modulação de frequências de disparos, amplitudes e da coerência de fase média quando modificamos o acoplamento por GJs, sob diversos valores da tortuosidade do meio extracelular e de unidade funcionais do modelo (ou tamanho da rede). No capítulo 6, estudamos o caso sem interações por GJs, considerando o efeito isolado da interação via CIs extracelulares, modulada pela tortuosidade e tamanho da rede, sobre disparos e sincronização. Finalmente, no capítulo seguinte fazemos algumas considerações finais e discutimos os mecanismos envolvidos na gênese e sustentação de AENS que não foram abordados nesta tese.

Capítulo 2

Revisão

2.1 Epilepsia

Epilepsia é considerada a desordem neurológica mais comum, atingindo cerca de 1% da população mundial. Também se estima que entre 5% e 7% terá pelo menos uma crise epiléptica ao longo da vida (da Silva e Cavalheiro, 2004; Sanabria et al., 2001). A palavra epilepsia vem do grego *epilamvanein* que significa ser acometido, ou pego de surpresa (da Silva e Cavalheiro, 2004), um termo originário da noção de ataque por entidades sobrenaturais, usualmente como punição; aliás, até hoje, a despeito dos avanços no diagnóstico e tratamento das epilepsias, ainda existe o estigma da possessão sobrenatural sobre os seus portadores (Engel et al., 2007; Gomes, 2006). Descrições acuradas de crises epilépticas vêm sendo feitas há mais de 3000 anos, por egípcios, sumérios, assírios, chineses e indianos, datando os relatos mais antigos de 3500 a.C. (da Silva e Cavalheiro, 2004). Atribui-se a um texto de Hipócrates, por volta de 400 a.C., a introdução da noção de uma causa neurológica, e não sobrenatural para as crises epilépticas, a qual poderia ser tratada com dietas e fármacos (Engel et al., 2007; Somjen, 2004). A concepção moderna de epilepsia surge no século XIX, com os trabalhos de diversos médicos e cientistas, com destaque para o britânico John Hughlings Jackson, segundo o qual “crise é uma descarga súbita, excessiva e rápida da substância cinzenta ¹” e que as crises podem ser categorizadas segundo critérios clínicos (Gomes, 2006). O enunciado de Jackson se assemelha à atual definição de crise epiléptica, segundo a qual é uma interrupção transitória das funções cerebrais normais provocada pela atividade neuronal hiper-síncrona e excessiva. Epilepsia não pode ser classificada como uma doença específica, e sim como um grupo de desordens neurológicas crônicas, caracterizadas pela ocorrência espontânea e recorrente de crises envolvendo populações de neurônios de várias regiões do córtex cerebral, tanto quanto por manifestações clínicas que incluem alterações demarcadas no comportamento (Engel et al., 2007; Somjen, 2004).

¹Substância cinzenta é formada por corpos neuronais, glia (astrócitos e oligodendrócitos), neurópila (dendritos e axônios mielinados ou não) e capilares no cérebro e na medula espinhal (Purves et al., 2004).

As epilepsias são classificadas segundo um conjunto de critérios, sendo o mais comum quanto à extensão do envolvimento de estruturas corticais do sistema nervoso (Engel e Scharwtzkroin, 2005). Deste modo, crises epiléticas podem ser classificadas como parciais ou generalizadas. No primeiro tipo a crise se origina em uma região localizada do cérebro, o foco. Quando há perda total ou parcial da consciência fala-se de crise parcial complexa, caso contrário este tipo de crise é definida como simples. As crises podem se espalhar por todo córtex, num processo conhecido como generalização secundária. Dependendo da localização do foco há manifestações motoras, somatosensoriais (auditivas, visuais, gustativas etc.), sensitivas e psíquicas. Crises parciais simples envolvem, em geral, estruturas do neocórtex; por outro lado, as crises parciais complexas atingem, comumente, estruturas do lobo temporal medial como a amígdala e a formação hipocampal (figura 2.1(b); (McNamara, 1994)).

As crises generalizadas comprometem de forma simultânea e simétrica os dois hemisférios cerebrais, desde o início da crise, e envolvem alterações na consciência, com manifestações motoras ou não. As crises tônico-clônicas, exibem manifestações clássicas, como as contrações e extensões musculares involuntárias e movimentos repetitivos (Engel e Scharwtzkroin, 2005).

2.2 Epilepsia do Lobo Temporal

O tipo de epilepsia mais comum em adultos é a epilepsia do lobo temporal (ELT), a qual afeta entre 40 e 50% de todos os pacientes epiléticos e se manifesta por crises parciais complexas (Guedes et al., 2006). É também a forma de epilepsia mais resistente aos fármacos anticonvulsivantes, mas que pode responder bem a intervenções cirúrgicas. Quando afeta estruturas do neocórtex, na superfície externa do lobo temporal (figura 2.1(a)), classifica-se a ELT como epilepsia do lobo temporal lateral. Por outro lado, se estruturas do sistema límbico são comprometidas, particularmente a amígdala, o hipocampo, o subículo e o giro parahipocampal, falamos de epilepsia do lobo temporal mesial (figura 2.1(b)). As estruturas atingidas na ELT mesial estão envolvidas em processos de controle das emoções, memória e aprendizagem, exibindo destacados fenômenos de plasticidade neural (Guedes et al., 2006). A esclerose hipocampal, a manifestação fisiológica mais comum, envolve perda seletiva de neurônios e gliose (proliferação de células gliais²; veja seção 3.2.5) e conseqüente atrofia do hipocampo (Andrade-Valença et al., 2006). Dentre as manifestações clínicas das crises epiléticas na ELT mesial estão incluídas alguns tipos de amnésia, alucinações olfativas, gustativas, auditivas e/ou visuais, sensações intensas de medo, amnésia, dentre outras (Andrade-Valença et al., 2006; Guedes et al.,

²Células gliais (ou glia, ou ainda neuroglia) são células de suporte às funções neuronais. São responsáveis por manter a homeostase, influenciam o desenvolvimento neuronal, bem como a recuperação após danos, além de outras funções (Purves et al., 2004).

2006).

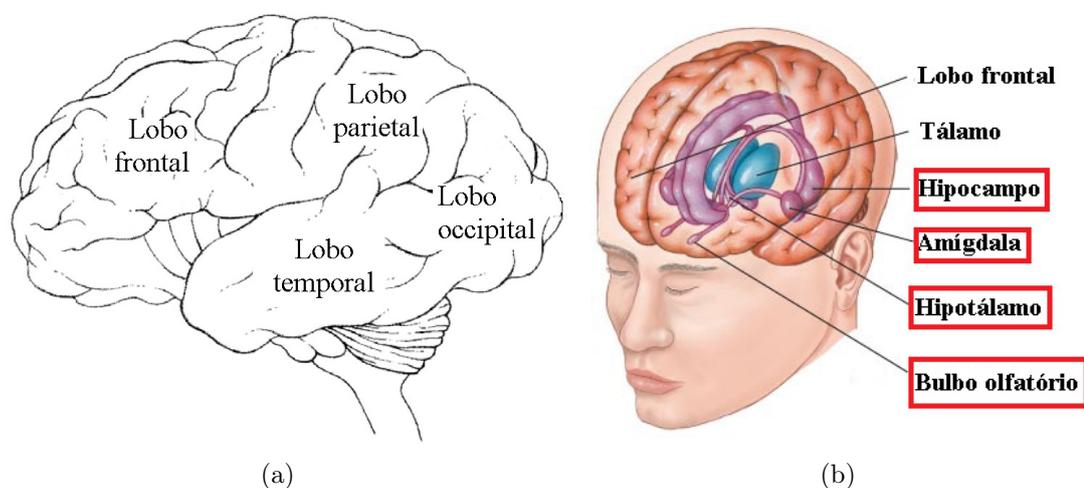


Figura 2.1: Lobo temporal medial e estruturas do sistema límbico. (a) Localização do lobo temporal no córtex cerebral (adaptado de Taupin (2007)). (b) Estruturas do lobo mesial temporal que constituem o sistema límbico, dentre elas a amígdala e o hipocampo (modificado de Morris e Maisto (2001)).

2.3 Hipocampo

O hipocampo é uma estrutura intensamente estudada, devido ao seu envolvimento em mecanismos de navegação espacial, formação de memórias e processos de aprendizagem, à alta susceptibilidade à geração de AEs e também à sua organização laminar, com estruturas celulares regularmente distribuídas em camadas, a qual permite um estudo facilitado de sua fisiologia, dentre várias outras razões (Andersen et al., 2006). O hipocampo está situado no lobo temporal medial e pertence ao sistema límbico. São dois os *hipocampi* presentes em mamíferos, cada qual uma imagem espelhada do outro, localizados em cada hemisfério cerebral. Tem a forma encurvada, característica que inspirou anatomistas do século XVI a lhe conferir o termo *hippocampus* (do grego cavalo-marinho; (Sweatt, 2003)).

Rafael Lorente de Nó, em seus estudos pioneiros de neuroanatomia, determinou que o giro dentado (GD) e o *Cornu Ammonis*, ou chifre de Ammon (CA) constituem o hipocampo (O’Keefe e Nadel, 1978). Estas são estruturas encurvadas que se assemelham a letras ‘C’ intercaladas (figura 2.2). Outra terminologia considera que o GD e o CA (juntamente com o complexo subicular e o córtex entorrinal) compõem a formação hipocampal, sendo as regiões do CA (CA1, CA2, CA3) denominadas de hipocampo propriamente dito. Estruturas celulares bem delimitadas em camadas (ou strata) constituem as regiões do hipocampo.

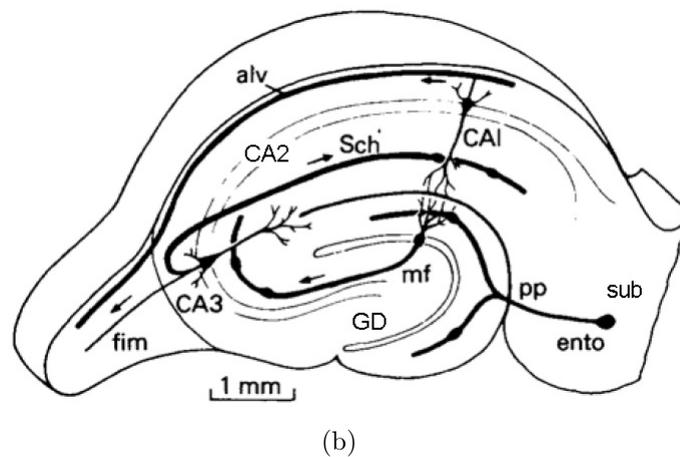
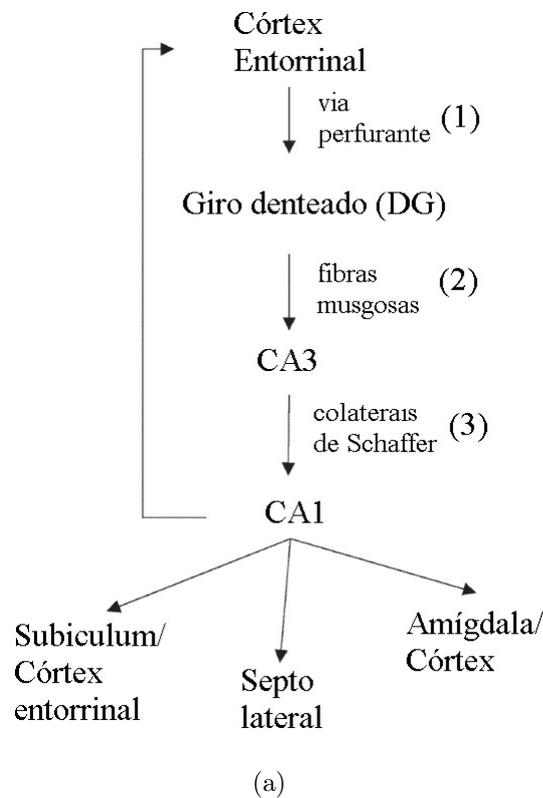


Figura 2.2: Hipocampo: circuito intrínseco e regiões principais. (a) Esquema do fluxo de informação pelas conexões intrínsecas da formação hipocampal (modificada de (Sweatt, 2003)). (b) Secção da formação hipocampal na qual observamos as regiões GD e CA, representação dos tipos celulares principais (células granulares no GD e piramidais no CA) e das vias que compõem o circuito tri-sináptico. Legendas: ento, córtex entorrinal; sub, subiculum; pp, via perforante; GD, giro dentado; fim, fimbria; alv, alveus; Sch, colaterais de Schaffer; mf, fibras musgosas (modificado de (O’Keefe e Nadel, 1978)).

O GD é formado por três camadas (de dentro para fora): polimórfica, granular e molecular (figura 2.2(b)). Na camada polimórfica, localizada no interior do hilus, predominam interneurônios largamente espalhados com várias morfologias. A camada principal, a granular, é uma área onde os corpos celulares de neurônios granulares e células gliais estão densamente empacotados, formando um grupo homogêneo com pequenos axônios. Na camada molecular se situam os dendritos proximais das células granulares. Os axônios das células granulares se organizam em um feixe, denominado feixe de fibras musgosas, que se projeta para os neurônios piramidais do CA3 (O'Keefe e Nadel, 1978). Os cinco estratos que constituem o CA são, de dentro para fora, o estrato lacunoso-molecular, radiado, piramidal, o oriens e o alveus. Os dois primeiros contêm os dendritos apicais dos neurônios piramidais cujos corpos celulares se encontram empacotados na camada piramidal, o principal estrato do CA. O estrato oriens contém dendritos basais e o estrato alveus os axônios piramidais que se projetam em direção à fimbria (figura 2.2(b)). As células piramidais do CA3 projetam axônios colaterais para o CA1, denominados colaterais de Schaffer. A região do CA1, por sua vez, também projeta axônios colaterais na direção do subículo e córtex entorrinal, além de outras regiões como o septo lateral e a amígdala (figura 2.2(a); (O'Keefe e Nadel, 1978; Taupin, 2007)).

Diversas áreas sensoriais do córtex enviam informações para o hipocampo, como por exemplo, o córtex visual, auditivo, somatosensorial e os córtices perirrinal e entorrinal, os dois últimos pela via perfurante (Taupin, 2007). Esta é formada por um conjunto de feixes axonais que inerva a face interna do GD (figura 2.2(b)). A via perfurante, as fibras musgosas e os colaterais de Schaffer constituem o circuito tri-sináptico.

O hipocampo é uma estrutura bastante suscetível à geração de AE, devido à organização de suas redes neurais, com presença massiva de conexões recorrentes, as quais reforçam a probabilidade de ativação neuronal. Vale dizer que a demanda metabólica do hipocampo está entre as mais altas do córtex devido, provavelmente, à alta densidade celular (O'Keefe e Nadel, 1978). Além disso, o arranjo ordenado de suas estruturas celulares permite uma influência importante de mecanismos de regulação de concentrações iônicas e também de interações não-sinápticas. Essas interações são importantes para a sustentação da hiperexcitabilidade e de altos níveis de sincronização (Jefferys, 1995; McCormick e Contreras, 2001).

2.4 Atividades epileptiformes e bases celulares

A identificação das descargas interictais (ou entre crises) no EEG (eletroencefalograma) é um método tradicionalmente usado para o diagnóstico das epilepsias focais. As descargas interictais podem assumir os padrões de espículas, ondas agudas, poli-espículas, ondas lentas de largas amplitudes e complexos do tipo espícula-onda. A espícula interictal (*interictal spike*) é o padrão mais simples identificável no EEG, com duração menor do que

70 ms, ocorrendo isoladamente sobre um plano de fundo de atividade não patológica (McCormick e Contreras, 2001). As AEs registradas no EEG são originárias de um padrão de descarga neuronal coletiva. A espícula interictal é resultado do disparo de salvas de PAs (*bursts*) em neurônios individuais. O *bursting* é um padrão comumente observado no sistema nervoso central de várias espécies animais, não necessariamente vinculado a uma patologia. A característica principal do *burst* epileptiforme é a mudança paroxística da despolarização (MPD; do inglês *paroxysmal depolarizing shift* (Kandel et al., 2003)), uma despolarização do potencial transmembrânico (PT) com duração relativamente longa e elevada amplitude, seguida de um período de hiperpolarização (McCormick e Contreras, 2001). Há evidências de que a MPD é gerado por correntes sinápticas e correntes de membrana intrínsecas (figura 2.3; (Bazhenov et al., 2008)).

O potencial de campo extracelular (PCE) é um registro da atividade coletiva de uma população de neurônios, numa escala espacial inferior aos registros do EEG. Durante um MPD o padrão típico do PCE é a queda da linha de base, ou do nível DC (figura 2.3). Quando as descargas da população de neurônios são altamente sincronizadas, observamos variações em alta frequência, sobrepostas à variação da linha de base, denominadas *population spikes*³. Estas são espículas observadas no meio extracelular, fruto dos disparo combinado de PAs de um conjunto de neurônios (Somjen, 2004).

As descargas interictais podem indicar uma progressão para uma crise completa, mas esta não é a regra geral (Avoli, 2001; Engel et al., 2007). Todavia, em vários modelos experimentais de crises induzidas há a transição de uma seqüência de descargas interictais para um padrão de descarga ictal, ou seja, característico de uma crise completa (Amzica e Steriade, 1999; Jensen e Yaari, 1988; Somjen, 2004).

As descargas ictais são plenamente identificáveis no EEG, pois apresentam padrão marcadamente distinto das oscilações não-patológicas. O recrutamento e a sincronização entre descargas neuronais delineiam o espalhamento da crise para neurônios na área de foco, ou para outras regiões corticais, quando há generalização secundária. Os fatores determinantes desses mecanismos de recrutamento e sincronização incluem a amplificação da excitação e/ou inibição sinápticas e a presença de circuitos sinápticos excitatórios recorrentes (Engel et al., 2007; Somjen, 2004), conexão por GJs (Traub et al., 2008), efeitos de campo elétricos (Jefferys, 1995) e elevação das concentrações extracelulares de potássio (Fröhlich et al., 2008a). Os dois últimos são classificados como mecanismos não-sinápticos, foco desta tese.

2.5 Conexões não-sinápticas

A neurotransmissão por sinapses químicas é o modo de comunicação entre neurônios predominante no sistema nervoso. Contudo, não é a única via de transmissão. Cada vez

³Não traduzimos o termo *population spike*.

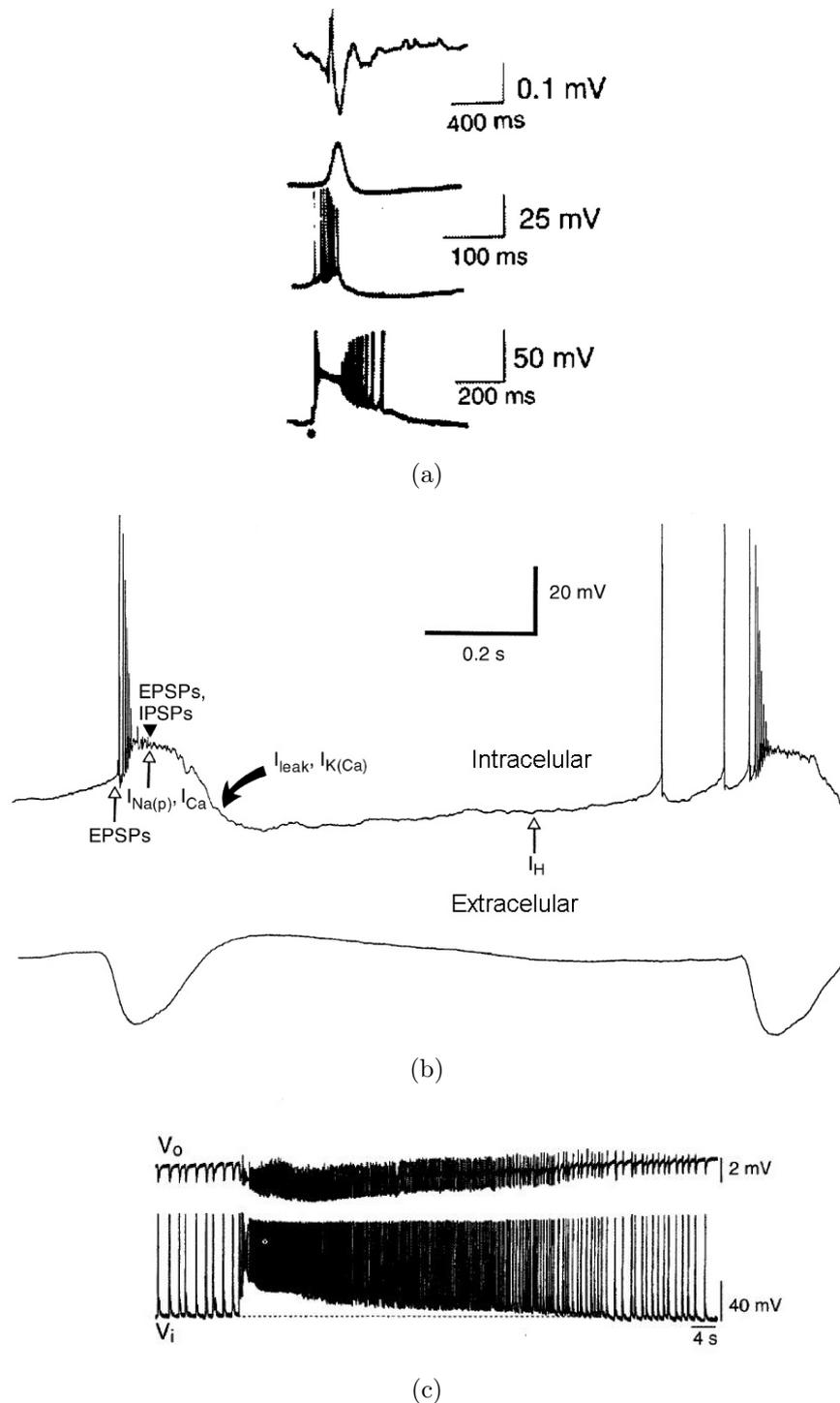


Figura 2.3: Padrões observados durante AEs. (a) Espícula interictal de registro de EEG (acima) e correlatos intracelulares (abaixo; modificado de (Somjen, 2004)). (b) MPD (acima) no qual atuam potenciais pós-sinápticos (EPSPs e IPSPs) e correntes de membrana intrínsecas ($I_{Na(p)}$, I_{Ca} , $I_{K(Ca)}$ e I_{leak} - corrente de sódio persistente, corrente de cálcio, corrente de potássio cálcio-dependente e corrente de vazamento, respectivamente). Abaixo segue o registro do PCE no qual o desvio da linha de base é proeminente (modificado de (Bazhenov et al., 2008)). (c) PCEs (acima) e *bursts* epileptiformes intracelulares (abaixo) registrados em células piramidais do CA1 durante crises induzidas pela elevação da concentração de potássio extracelular (extraído de (Somjen, 2004)).

mais as conexões não-sinápticas⁴ são reconhecidas como relevantes para o funcionamento normal do cérebro e também para uma série de patologias, principalmente nas epilepsias. Em geral, as conexões não-sinápticas são aquelas nas quais não há um processo clássico de neurotransmissão; ou seja, não há encapsulamento de neurotransmissores, seguida de liberação na fenda sináptica, com a posterior geração de potenciais pós-sinápticos. Deste modo, alguns autores consideram quatro as principais classes de interações não-sinápticas, as quais envolvem, fundamentalmente, modulação por íons e campos elétricos. São elas: o acoplamento eletrotônico por GJs, o acoplamento efáptico (definido a seguir), as interações por efeito de campo e as variações das concentrações iônicas extracelulares (Dudek et al., 1998; Jefferys, 1995). Outros tipos de interação neuronal não-sináptica incluem a comunicação via diversos sinalizadores como neurotransmissores, fatores tróficos, enzimas e gases como NO e CO₂. Esses sinalizadores se difundem pelo meio extracelular e por isso este tipo de comunicação é denominado transmissão por volume (Agnati et al., 2006; Alger, 2002).

Em 1982, o debate sobre o papel dos mecanismos não-sinápticos na pesquisa em epilepsia cresceu consideravelmente. Os trabalhos de Taylor e Dudek (1982; (Taylor e Dudek, 1982)) e Jefferys e Haas (1982; (Jefferys e Haas, 1982)) atestam que a indução de AEs em fatias de hipocampo se mantém mesmo se suprimindo a neurotransmissão em sinapses químicas, por eliminação do cálcio da solução de perfusão. Nesses experimentos, o fator de indução das atividades foi o acréscimo da concentração de potássio extracelular, que aumenta a neuronal. Logo, foi possível registrar PCEs, caracterizados por *population spikes*, os quais acontecem devido às descargas neuronais sincronizadas. Isto levou os autores a propor a atuação de alguma combinação dos efeitos da variação das concentrações iônicas extracelulares, acoplamento eletrotônico por GJs e efeitos de campo elétrico como mecanismos de causa e sustentação das atividades (Jefferys e Haas, 1982).

As GJs são conexões formadas por grupos de seis proteínas, as conexinas, existentes em cada par de células conectadas (figura 2.4; (Purves et al., 2004)). Essa estrutura permite o contato direto entre os citoplasmas neuronais, possibilitando o fluxo passivo e direto de íons, ou outras espécies químicas, uni ou bidirecionalmente. Tal característica faz com que as GJs sejam conhecidas como sinapses elétricas. Há várias evidências atribuindo às GJs a capacidade de sincronizar as descargas neuronais (Hormuzdi et al., 2004; Perez-Velazquez e Carlen, 2000; Perez-Velazquez et al., 2001, 1994). Elas permitem rápida transmissão de correntes, numa escala tempo de fração de milissegundos, comparadas às sinapses químicas, nas quais a geração de potenciais pós-sinápticos acontece em dezenas de milissegundos. GJs também induziriam oscilações muito rápidas (ou *very fast oscillations*), um padrão bastante observado durante as transições das atividades interictais para atividades ictais (Traub et al., 2008). Neste caso, as GJs, localizadas entre axônios de neurônios corticais, amplificariam as excitações sinápticas, facilitariam a geração de

⁴A definição de conexão não-sináptica segue a nomenclatura introduzida por Jefferys (Jefferys, 1995)

PAs e facilitariam a formação de *bursts*. A intensidade dessas conexões pode ser variada pela acidificação do meio intracelular, pela aplicação de bloqueadores como octanol ou halotano. Essas estruturas foram identificadas nos tipos celulares principais do hipocampo (Dudek et al., 1998; Rodrigues, 2003).

Efapse, uma palavra grega que significa tocar, contrasta com o termo sinapse, o qual implica contato forte ou união. No entanto, o termo denomina as interações por campos elétricos entre superfícies neuronais muito próximas, mas que não se tocam, ou em regiões onde o espaço extracelular é bastante reduzido. Na década de 40, Arvanitaki demonstrou que dois axônios próximos em um fluido de baixa condutividade podem interagir, pois as despolarizações em um deles induziam despolarizações no segundo (Jefferys, 1995); figura 2.5). Alguns autores não consideram as interações efápticas um mecanismo independente de transmissão não-sináptica e sim um tipo de interação por efeito de campo (Rodrigues, 2003).

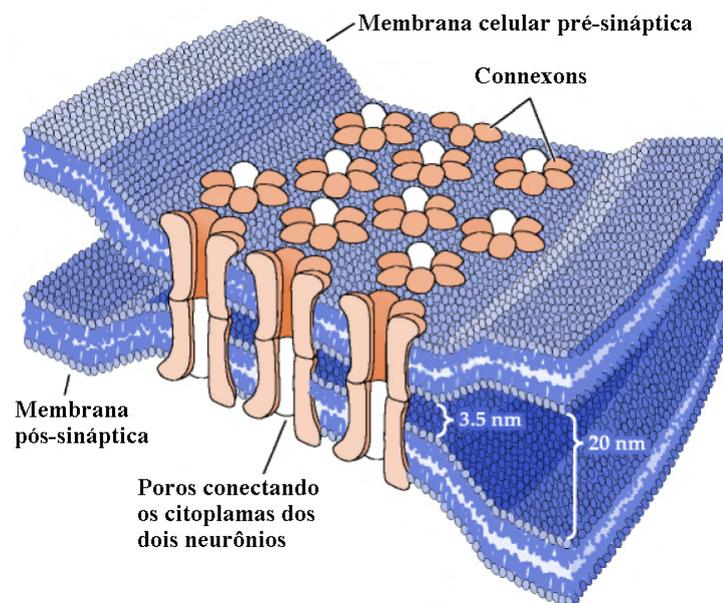


Figura 2.4: Esquema da conexão por GJs no qual se destacam os poros formados pelas proteínas connexinas, cada qual formada pelo arranjo de seis pares de connexons. Modificado de (Purves et al., 2004).

Durante o disparo de PAs, há produção de correntes iônicas no espaço extracelular, as quais geram campos elétricos que influenciam os potenciais transmembrânicos dos neurônios da vizinhança (figura 2.6). Este tipo de interação, denominado efeito de campo elétrico (ou efeito de campo) não exige uma grande proximidade entre as estruturas integrantes. Logo, não deve ser confundido com a transmissão efáptica.

As correntes iônicas lançadas ao meio extracelular devem retornar à célula, satis-

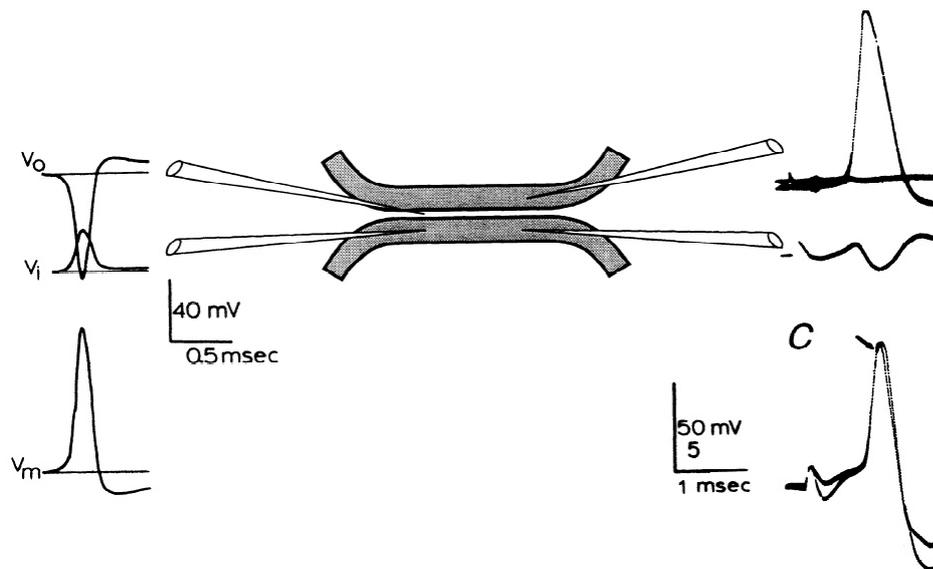


Figura 2.5: Exemplo de interações efápticas entre axônios gigantes de lula (extraído de (Jefferys, 1995)).

fazendo a uma condição de eletroneutralidade, pois se tratam de correntes endógenas (supondo-se não haver correntes externas aplicadas à célula). Sendo assim, formam-se laços de corrente no meio extracelular (figura 2.6), gerando campos elétricos os quais atuam sobre os neurônios nas vizinhanças. Por exemplo, um neurônio inativo pode se despolarizar em função de tais campos extracelulares (Holt, 1998; Nunez e Srinivasan, 2005). As correntes iônicas extracelulares podem ter origem sináptica ou nos PAs.

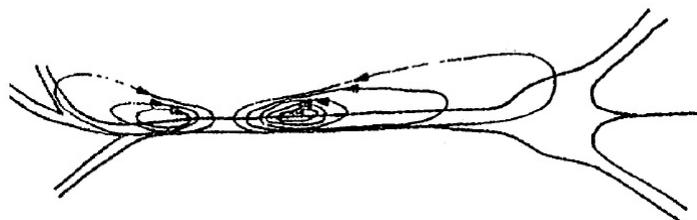


Figura 2.6: Correntes iônicas lançadas ao meio extracelular, a partir do axônio do neurônio esquemático, devido à propagação de um PA. Essas correntes iônicas extracelulares geram os campos elétricos os quais alteram os potenciais de membrana de neurônios da vizinhança. Modificado de (da Silva, 2002)

A depender do alinhamento de uma população de neurônios, os seus campos elétricos podem se reforçar produzindo potenciais de campo intensos da ordem de vários mV. No hipocampo, a alta densidade celular e a estrutura morfológica organizada de forma laminar, com o alinhamento dos somas de células piramidais e granulares oferece um ambiente propício aos efeitos de campo elétrico. Essas condições permitem o recrutamento

de células inativas e a sincronização entre os seus disparos, favorecendo o aparecimento de crises epiléticas e sua propagação. Os efeitos de campo podem atuar em conjunto com o acoplamento por GJs, reforçando a sincronização dos PAs (Dudek, 2004). Os efeitos de campo também dependem da resistividade do tecido, variável durante as atividades neuronais. Em um regime de intensa atividade da população de neurônios, há o aumento dos volumes celulares, resultando em um aumento de resistividade do tecido. Isto, por sua vez, amplifica os efeitos de campo (Fox et al., 2004).

Os íons no meio extracelular atuam como elementos de acoplamento entre neurônios e outros tipos celulares. Essa transmissão, que não exige a participação de estruturas celulares especializadas, como fendas sinápticas ou GJs, é um tipo de transmissão por volume (Agnati et al., 2006). Os íons principais são K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} e Mg^{2+} . Os efeitos mais importantes incluem controle sobre propriedades da membrana neuronal, como a excitabilidade, alterações do volume celular e no modo de operação de canais iônicos e outras proteínas transportadoras. Além disso, também modulam a neurotransmissão. A variação das concentrações iônicas extracelulares é importante para entender patologias e disfunções como epilepsia, depressão alastrante, encefalopatia hipóxica e acidente vascular cerebral (Fröhlich et al., 2008b).

Os efeitos do potássio extracelular sobre as AEs têm sido objeto de intenso debate desde meados dos anos 60 (Jefferys, 1995; Somjen, 2004). Aumento da $[K^+]_o$ modula a excitabilidade neuronal, modifica a resistência da membrana celular, atuando ainda sobre a transmissão sináptica. Elevações da $[K^+]_o$, abaixo de uma faixa específica (cerca de duas vezes a concentração basal no GD do hipocampo de ratos, cerca de 4,0 mM) pouco modificam a excitabilidade neuronal. Isto acontece porque as flutuações das concentrações de K_o^+ garantem a baixa variação do potencial de repouso. Todavia, além da faixa específica, o PT cresce com $[K^+]_o$, aproximando-se do potencial de Nernst para esse íon (figura 2.7). O resultado é a despolarização neuronal, com o potencial tendendo a alcançar o limiar para disparo de PAs (Somjen et al., 2008). Outro efeito do crescimento da $[K^+]_o$ é a queda da resistência de membrana devido à elevação da probabilidade de abertura de canais iônicos. Além disso, o acúmulo de potássio extracelular pode modificar o funcionamento de canais iônicos e cotransportadores, notadamente os cotransportes cátion-cloreto (Almeida et al., 2008).

A hipótese do acúmulo de potássio extracelular como causa para crises epiléticas surgiu a partir de observações do aumento de excitabilidade com o crescimento da $[K^+]_o$ (Fertziger e Ranck, 1970; Green, 1964). Segundo essa hipótese, sob condições normais, $[K^+]_o$ oscila em torno de um valor basal devido às atividades fisiológicas. Um aumento transitente da $[K^+]_o$ induz crises epiléticas porque a liberação de potássio durante os disparos conduz a um círculo vicioso de aumento de excitabilidade e de novo acúmulo de K_o^+ (Fröhlich et al., 2008a; Somjen et al., 2008). Eventualmente, o excesso de excitabilidade inativa canais para sódio encerrando a crise. De fato, durante crises epiléticas, registros

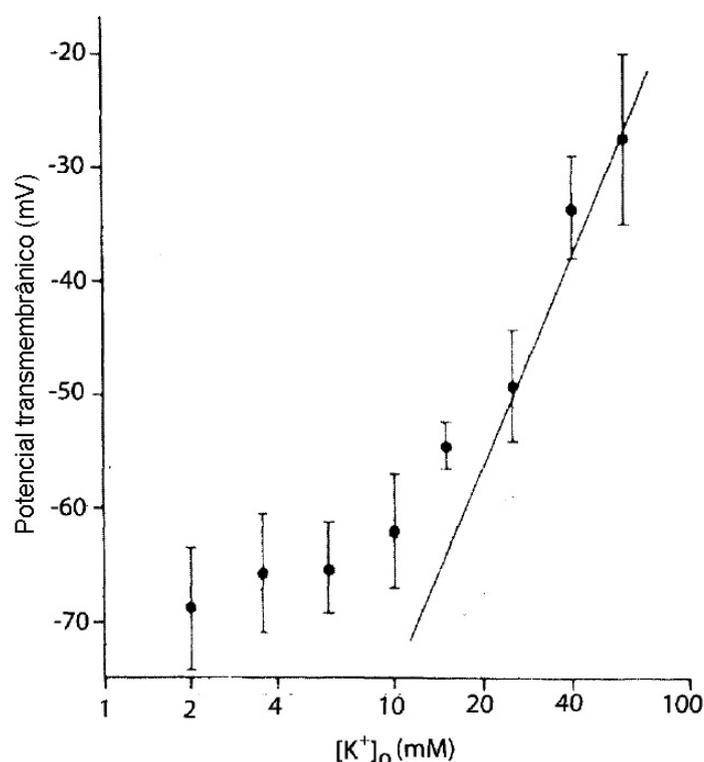


Figura 2.7: Variação do PT com $[K^+]_o$ (em células do glânglio dorsal de ratos). Cada ponto representa a média com o desvio padrão. As abscissas foram expressas numa escala logarítmica. Concentrações acima de 10mM aproximam o PT do potencial de Nernst do potássio (linha reta). Adaptado de (Somjen, 2004).

com eletrodos seletivos a potássio demonstram o acúmulo desse íon em experimentos *in vivo* e *in vitro* (Jefferys, 1995; Jensen e Yaari, 1997; Traynelis e Dingledine, 1988). No entanto, algumas evidências levaram à rejeição da hipótese. Há dificuldade em definir um limiar de acúmulo de K_o^+ no início de uma crise, pois as observações indicam que $[K^+]_o$ não cresce monotonicamente durante as crises; em vez disso, $[K^+]_o$ cresce durante a fase ativa do *bursting* e decresce na fase silenciosa. Também poucas evidências demonstram a inativação de canais para sódio com o excesso de excitabilidade, fenômeno denominado bloqueio por despolarização (Bikson et al., 2003). Além disso, a concentração de potássio cresce em atraso com relação ao início da crise, ao invés de uma elevação adiantada ou concomitante. Logo, o aumento de $[K^+]_o$ deve ser consequência e não causa das crises epiléticas. Para finalizar, também foram medidas elevações de $[K^+]_o$, para valores observados durante crises, com a estimulação elétrica de tecido saudável do córtex, sem indução de AEs (Fröhlich et al., 2008a; Somjen, 2004).

Alguns autores sugerem uma variante da hipótese do acúmulo de potássio extracelular para explicar as transições interictal-ictal (Jensen e Yaari, 1997). Modelos computacionais, que incorporam a dinâmica das concentrações iônicas agregam essa variante (Almeida et al., 2008; Fröhlich et al., 2008b; Somjen et al., 2008). Essas observações e modelos

também indicam que alterações dos mecanismos de homeostase de K_o^+ podem explicar o acúmulo durante crises epiléticas.

Cálcio e magnésio também atuam sobre o PT. A redução das concentrações desses íons reduz a excitabilidade neuronal, aumentando a resistência de membrana pelo mecanismo de blindagem superficial de carga. Na superfície externa da membrana neuronal há uma concentração de cargas ou resíduos negativos, que se ligam aos cátions do meio extracelular, especialmente aos cátions divalentes. A ligação desses cátions eleva o PT total (soma das contribuições capacitiva, superficial, intra e extracelular). A remoção dos cátions reduz o PT, aumentando a probabilidade de abertura dos canais e, portanto, reduzindo a resistência de membrana.

Outro efeito importante desses íons é a modulação da neurotransmissão. A redução da $[Ca^{2+}]_o$ inibe a liberação de neurotransmissores, pois esse íon é pré-requisito para a fusão de vesículas no terminal pré-sináptico (Purves et al., 2004; Somjen, 2004). Por outro lado, o aumento dessa concentração também eleva a excitabilidade no terminal pós-sináptico. Uma redução abaixo de 0,2 mM pode bloquear as transmissões sinápticas facilitando o aparecimento de *bursts* espontâneos (Jefferys e Haas, 1982; Taylor e Dudek, 1982). Aliás, o protocolo de redução de cálcio na solução de perfusão é bastante utilizado para indução de crises sustentadas por mecanismos não-sinápticos. Outro protocolo para indução de crises consiste na diminuição de $[Mg^{2+}]_o$, reduzindo a excitabilidade e inibindo as transmissões sinápticas (Engel et al., 2007).

Os efeitos principais das variações de sódio e cloreto se relacionam às modificações da pressão osmótica as quais provocam alteração dos volumes celulares. NaCl extracelular tamb atua sobre as transmissões sinápticas, havendo uma estimulação à neurotransmissão quando as concentrações desse sal se reduzem ou quando se diminui a osmolaridade do fluido extracelular (Somjen, 2004). A hipotonicidade extracelular produz um aumento dos volumes celulares, reduzindo o espaço intersticial e favorecendo as interações por efeito de campo (Azouz et al., 1997; Kilb et al., 2006).

Durante crises epileptiformes, as concentrações intracelulares de sódio tendem a crescer, pois os disparos de PAs necessitam de influxos de sódio. O mesmo acontece com $[Cl^-]_i$, pelo desbalanceamento de mecanismos de transporte, notadamente dos cotransportadores cátion-cloreto. Como vimos, a elevação das concentrações extracelulares de potássio altera o modo de operação desses transportadores. Algumas observações experimentais apontam para o efeito anticonvulsivante de diuréticos, os quais têm os cotransportes KCC e NKCC como alvos, nas crises epiléticas em recém nascidos (Dzhala et al., 2005; Fukuda, 2005).

2.6 Modelos para o estudo das epilepsias

2.6.1 Modelos animais

Um modelo animal de doença é uma reprodução em espécies não-humanas de condições patológicas, permitindo a realização de procedimentos inacessíveis em seres humanos (Fagundes e Taha, 2004). Além disso, facilitam a obtenção de um número de amostras estatisticamente representativo. Os modelos animais possibilitaram entender os mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares da epilepsia. Os estudos em modelos animais abrangem as preparações *in vivo* e *in vitro* (figura 2.8). Nas preparações *in vitro* estuda-se um sistema simplificado e representativo do animal intacto, no qual se preservam as estruturas de interesse. Além disso, oferecem estabilidade mecânica, fundamental aos registros eletrofisiológicos, fácil visualização de estruturas microscópicas e o controle de fármacos e íons extracelulares na solução de banho (Engel et al., 2007).

As preparações *in vitro* principais compreendem células dissociadas, culturas dissociadas, fatias, culturas de fatias, regiões cerebrais isoladas e cérebro isolado. Dentre estas as fatias de hipocampo são, talvez, a preparação mais utilizada na pesquisa em epilepsia. Essas fatias são mantidas em condições próximas das fisiológicas, por várias horas, utilizando uma solução artificial do fluido cérebro-espinal (do inglês *artificial cerebral spinal fluid*). Deste modo, pode-se acessar várias características do tecido e preservar parte de sua organização. A maioria dos estudos de fatias *in vitro* utiliza o registro eletrofisiológico, nas modalidades intra e extracelular. O registro extracelular mede respostas de uma população de neurônios enquanto que a modalidade intracelular capta respostas de uma única célula. A estrutura lamelar e a orientação regular dos tipos celulares do hipocampo tornam esta região especialmente apropriada a esta preparação, onde o controle da espessura preserva intactas as redes de neurônios de interesse (Bernard, 2005).

Classificam-se os modelos de epilepsia *in vitro* em agudos e crônicos. Nos modelos agudos são induzidas AEs, de maneira relativamente abrupta no tecido normal. Isto permite estudar as mudanças nas propriedades celulares ou da rede de neurônios que converteram o tecido normal em tecido epiléptico. Nos modelos crônicos o tecido vem de um doador, animal ou humano, cronicamente epiléptico. O objetivo desses estudos é entender as mudanças fisiológicas que alteraram cronicamente o tecido epiléptico (Engel et al., 2007; Engel e Scharwtzkroin, 2005). O modelo animal utilizado como base do estudo desta tese é um modelo agudo de epilepsia em fatias de hipocampo *in vitro*.

2.6.2 Modelos computacionais

A epilepsia é uma desordem com origem em mecanismos fisiológicos que evoluem no tempo, baseados em propriedades emergentes de sistemas complexos sub-celulares, celulares e macroscópicos. Determinar como tais mecanismos atuam conjuntamente, nos

fenômenos epilépticos, por meio de investigações experimentais, exclusivamente, se torna bastante difícil. Por esta razão, cada vez mais as investigações teóricas, com o emprego de ferramentas computacionais vêm assumindo um papel importante para entender as causas dessa desordem (Lytton, 2008; Wendling, 2005).

Com relação aos mecanismos celulares das AEs, as atuais técnicas de registro eletrofisiológico permitem acompanhar, com boa resolução temporal, um número restrito de variáveis fisiológicas. Isto é o caso, por exemplo, das correntes iônicas de um dado mecanismo de transporte, como as correntes de um canal iônico. Todavia, para entender as interações de diversos mecanismos, o que requer observar muitas variáveis simultaneamente, o uso de simulações computacionais se mostra bastante eficaz (Kager et al., 2007). Os trabalhos teóricos de Kager e colaboradores (2007) (Kager et al., 2007), bem como de Somjen e colaboradores (2008) (Somjen et al., 2008) ilustram bem tal situação. Nesses trabalhos, procurou-se entender a origem de AEs por meio da construção de um modelo realista de célula hipocampal piramidal, incorporando-se um espaço intersticial e um sistema de recaptação glial no segundo estudo. Esses trabalhos investigam o papel da dinâmica das concentrações iônicas sobre diversos mecanismos, como canais iônicos, trocadores e bombas para induzir e modificar padrões de disparo como o *bursting* e o *spiking*⁵.

Os modelos computacionais também podem ser usados para conectar processos fisiológicos em níveis hierárquicos diferentes (molecular, celular, de redes e sistemas; figura 2.8), permitindo entender o problema num determinado nível como função dos demais (Lytton, 2008; Wendling, 2008). Por exemplo, a origem e propagação de crises em uma rede de neurônios podem ser entendidas examinando-se os mecanismos celulares de controle de excitabilidade neuronal. Recentemente, os trabalhos de Cressman, Ullah e colaboradores utilizaram essa abordagem, examinando o papel da dinâmica das concentrações iônicas em um modelo simples de neurônio (Cressman Jr. et al., 2009) incorporado a numa rede no estudo subsequente (Ullah et al., 2009).

Outras funções da modelagem computacional incluem integrar dados experimentais dos diversos níveis hierárquicos para propor explicações e mecanismos para os fenômenos epilépticos (Soltesz e Staley, 2008). Também detectar padrões nas observações experimentais não aparentes à percepção humana para predição de crises (Mormann et al., 2000; Quyen et al., 2001).

Além da descrição de mecanismos fisiológicos, os modelos computacionais na pesquisa em epilepsia analisam e classificam as manifestações clínicas e avaliam os impactos sócio-econômicos da desordem (Lytton, 2008).

⁵Disparo continuado de potenciais de ação.

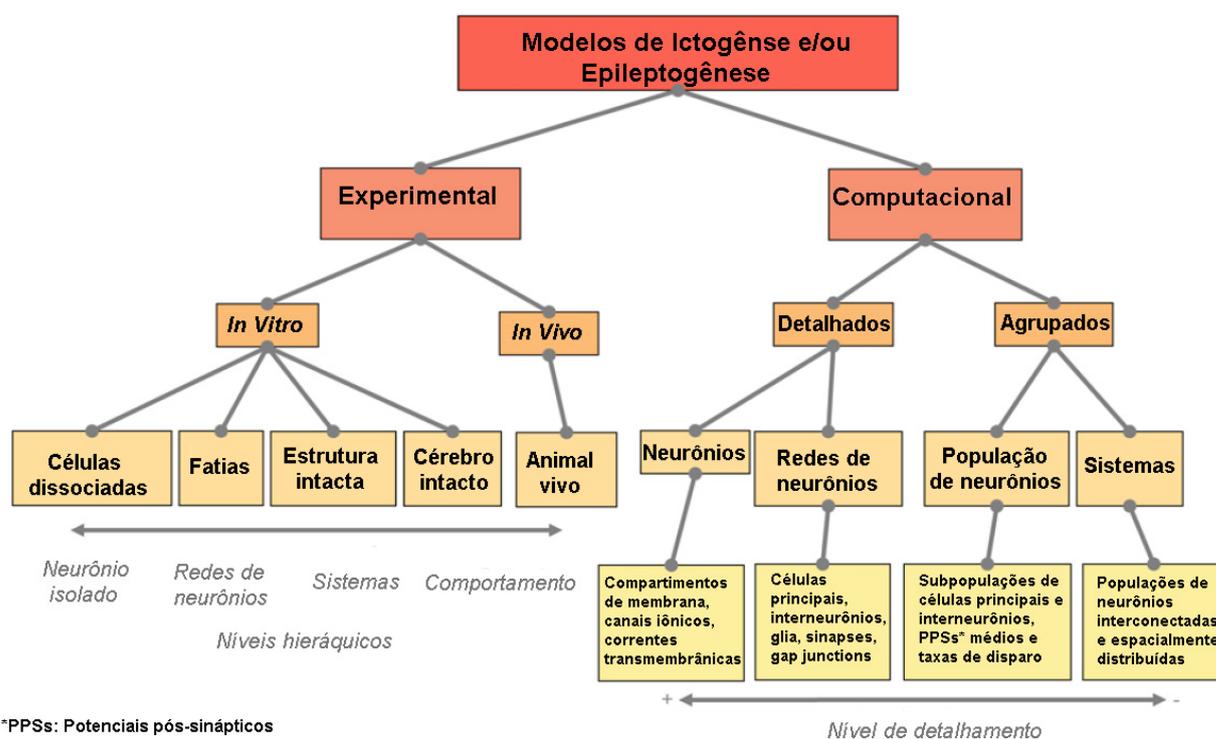


Figura 2.8: Modelos animais e computacionais classificados de acordo com o nível hierárquico da estrutura objeto da investigação. Os modelos computacionais, também são classificados quanto ao nível de detalhamento, podendo ser detalhados ou agrupados. Modificado de (Wendling, 2008).

Capítulo 3

Modelo AENS

3.1 Arquitetura

O modelo AENS (atividades epileptiformes não-sinápticas) *in vitro*, proposto por Almeida *et al* (2008) (Almeida et al., 2008), representa a camada granular do GD, numa fatia de hipocampo, como uma rede tridimensional de compartimentos (figura 3.1). Cada unidade funcional da rede é formada pelo soma de uma célula granular e uma célula glial imersos no espaço extracelular (ou meio extracelular, ME). Uma unidade funcional possui volume igual a $20\mu m^3$. Para simular a solução de perfusão, um plano de compartimentos, no qual não há células, cerca todos as faces da rede exceto o plano que representa a interface líquido-gás. Neste plano as CIs são fixas, para representar o volume infinito efetivo da solução de perfusão em relação ao volume extracelular de cada unidade funcional. Além disso, no plano representante da interface líquido-gás os gradientes de CI na direção ortogonal são nulos, pois não há perfusão nesta face. Deste modo, uma interface impermeável representa uma barreira refletora para a difusão explicando a derivada normal nula nas concentrações (figura 3.2).

Nas simulações do presente trabalho utilizamos uma camada única para representar a perfusão, ao invés de duas, como nos trabalhos de Rodrigues (2003) e Almeida *et al* (2008), para evidenciar efeitos de aleatoriedade das condições iniciais e permeabilidades. Com esta modificação, as alterações das CIs intra e extracelulares em cada unidade funcional apresentam variação temporal mais rápida e amplitudes mais acentuadas. Além disso, incluímos efeitos capacitivos à membrana neuronal para atender às variações dos PTs na escala de tempo dos potenciais de ação.

Para simular o protocolo alto- K^+ e zero- Ca^{2+} , fixa-se a concentração de potássio extracelular em 8 mM, no plano que simula a perfusão, alguns segundos após o início da simulação. Este valor, o dobro das medidas regulares da $[K^+]_o$ no hipocampo de ratos, induz um aumento de excitabilidade em toda a rede. A remoção de Ca^{2+} assume células granulares conectadas apenas por mecanismos não sinápticos, simulando o bloqueio de neurotransmissão que ocorre quando se usa uma solução de perfusão com ausência deste

íon.

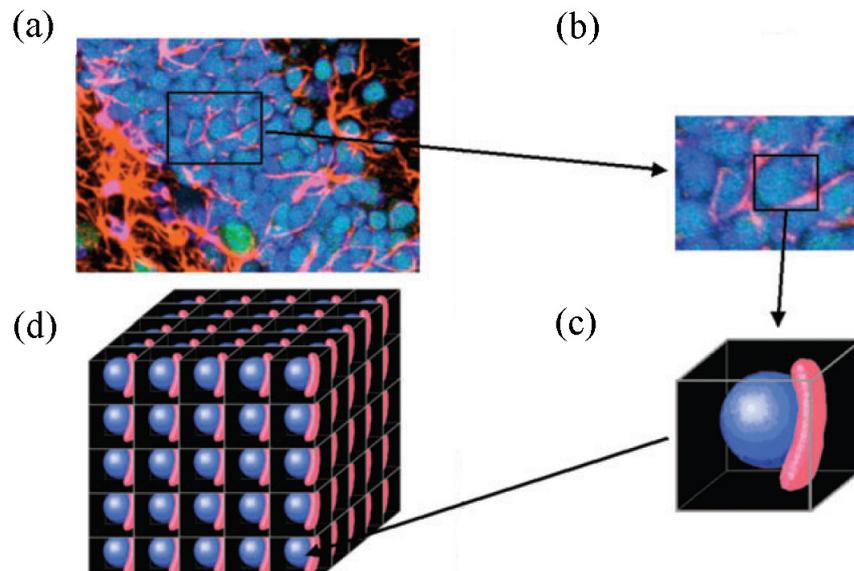


Figura 3.1: Arquitetura do modelo. (a) Camada granular do GD numa fatia de hipocampo de ratos é representada por uma estrutura tridimensional. (b) Soma de uma célula granular (em azul) e de glia (em vermelho). (c) Representação geométrica de (b) constituindo uma unidade funcional. (d) O conjunto de unidades funcionais forma uma rede cúbica. Reproduzido de (Almeida et al., 2008).

3.2 Transporte iônico

A membrana celular, formada por uma bicamada lipídica, representa uma barreira de separação entre o meio intracelular (MI) e o ME, contendo proteínas integrais responsáveis por diversas funções fisiológicas. Uma função importante é o transporte de íons e outras espécies químicas, os quais não conseguiriam atravessar a barreira lipídica por difusão. O transporte iônico seletivo regula as diferenças de concentração entre o MI e o ME permitindo a geração de PTs. Além disso, no modelo, os mecanismos transportadores têm papel chave para a geração e sustentação de *bursts* epileptiformes. Os mecanismos de transporte, incorporados às membranas celulares em cada unidade funcional, compreendem canais iônicos dependentes e independentes de voltagem (Hille, 2001), bomba- Na^+/K^+ (Kaplan, 1985), co-transportes cátion-cloreto (Payne, 1997), trocadores (Chesler, 2003) e GJs (Hormuzdi et al., 2004), além do sistema de recaptção por glias (Fröhlich et al., 2008a) (figura 3.3).

A seguir descrevemos brevemente os principais mecanismos de transporte, bem como o sistema de recaptção por glias. GJs serão discutidas na seção 3.4.1

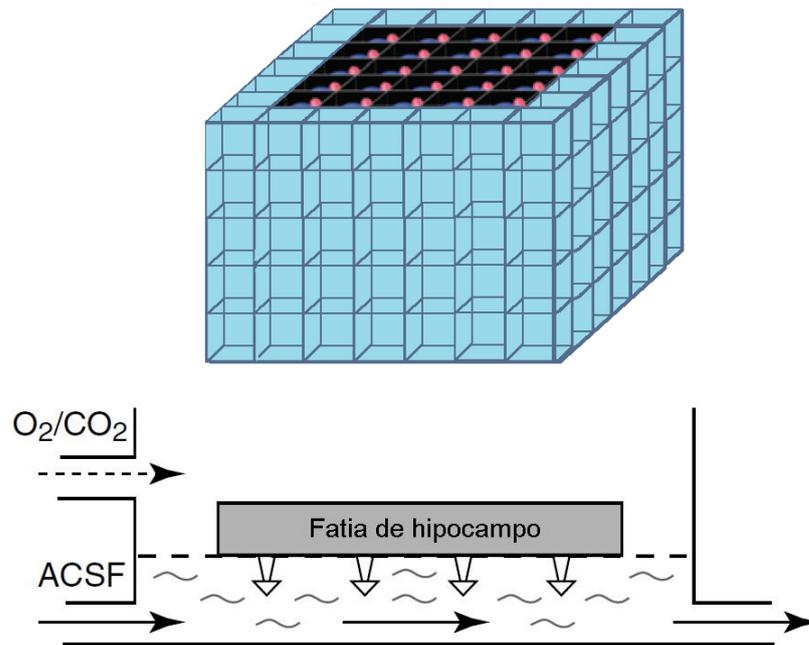


Figura 3.2: Representação da perfusão no modelo AENS. Em (a) uma camada extra de compartimentos cerca a rede cúbica, contendo somente íons cujas concentrações são fixas. Uma das faces da rede cúbica não recebe a camada extra para representar a interface líquido-gás sobre a fatia. (b) foi adaptado de (Hrabítoová e Nicholson, 2007).

3.2.1 Canais iônicos

Canais iônicos são proteínas integrais de membrana, dotadas de poros intermediando o transporte passivo de íons, os quais podem ser ativados por variações no PT (canais dependentes de voltagem) ou pela ligação com espécies químicas (canais ativados por ligantes), dentro de uma variedade de possibilidades. No modelo são incorporados canais dependentes e independentes de voltagem. A equação de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK; eq.(3.5)) descreve os fluxos ou correntes iônicas, as quais dependem de CIs e do PT (Hille, 2001) (por hipótese, há eletrodifusão no canal iônico com o campo elétrico no interior da membrana sendo constante). A escolha desta relação representa um diferencial sobre os tradicionais modelos de atividade neuronal (Canavier et al., 1991; Park e Durand, 2006), nos quais são usadas representações em circuito da membrana celular para calcular a corrente por canais iônicos, desconsiderando-se variações intensas das CIs, as quais normalmente acompanham as atividades epileptiformes. As seguintes correntes iônicas via canais foram incorporadas:

1. Corrente de sódio transiente ($I_{Na,t}$): responsável pela fase de despolarização dos PAs.
2. Corrente de potássio retificadora com atraso¹ ($I_{K,rt}$): controla a fase de repolarização

¹do inglês *delayed rectifier*

do potencial de ação e a excitabilidade neuronal. Também regula a concentração de potássio no ME.

3. Corrente de sódio persistente ($I_{Na,p}$): Atua na fase inicial de despolarização neuronal, precedendo o disparo de PAs. Controla a frequência dos PAs e também participa do controle da excitabilidade neuronal.
4. Corrente de potássio do tipo A ($I_{K,A}$): controla a frequência de disparo de potenciais de ação e também $[K^+]_o$.
5. Corrente de cloreto constante ($I_{Cl,const}$): participante da regulação do potencial de repouso neuronal.
6. Corrente de cloreto dependente de voltagem ($I_{Cl,volt}$): permite o fluxo de Cl^- para o MI, sob condições fisiológicas ordinárias e regula a concentração extracelular de cloreto.

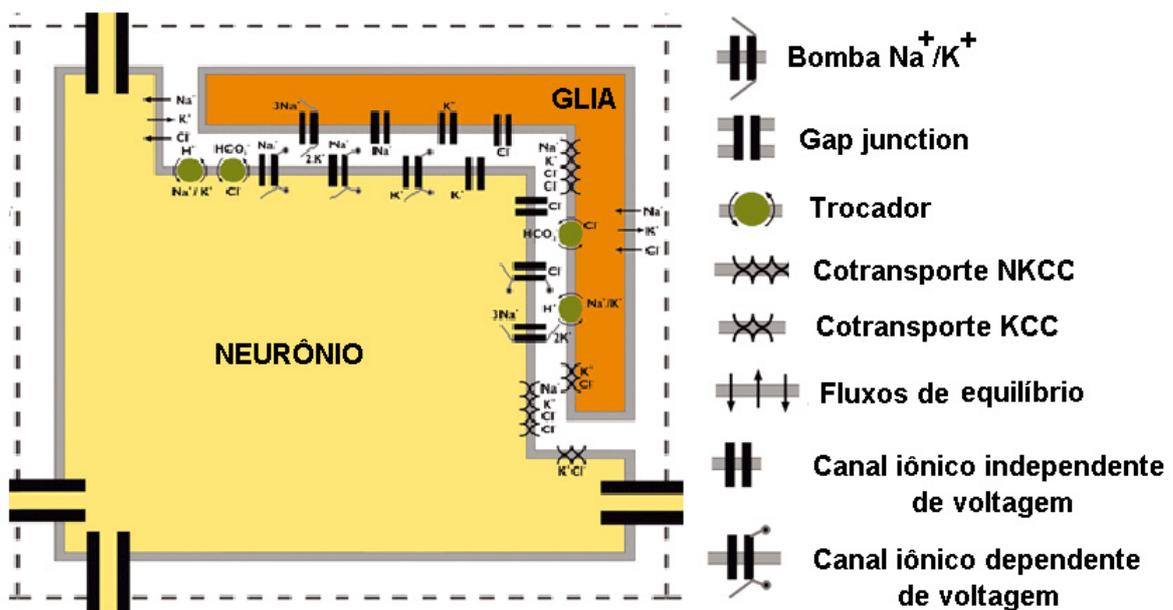


Figura 3.3: Esquema dos mecanismos de transporte iônico em uma unidade funcional, os quais compreendem canais iônicos, bomba- Na^+/K^+ , trocadores, cotransportadores cátion-cloreto e GJs. O sistema de recaptção glial, que se apresenta com vários transportadores iônicos nas membranas das glias, controla as CIs extracelulares. Reproduzido de (Almeida et al., 2008).

3.2.2 Bomba- Na^+/K^+

A Na^+/K^+ -ATPase é uma enzima que realiza o transporte (por ciclo) de três íons Na^+ para o ME e dois íons K^+ para o MI, com o consumo de uma molécula de ATP

sob condições normais fisiológicas (reação direta). O transporte é ativo, ou seja, depende diretamente da energia obtida pela reação de quebra do ATP metabólico em ADP e fosfatos. Além disso, é um transporte eletrogênico porque gera uma corrente iônica a qual modifica o PT. Esta enzima mantém em níveis constantes os gradientes de concentração de sódio e potássio no repouso. Também contribui para regular o volume celular, pois ajuda a controlar as concentrações intracelulares desses íons (Kaplan, 1985).

O modelo se baseia no esquema cinético cíclico de Albers-Post (Horisberger, 2004) para derivar duas equações que predizem a formação de um íon fictício A^+ , saldo do transporte de $3Na^+$ contra $2K^+$. Esse íon é formado no MI, quando a reação é direta, ou no ME quando se reverte o ciclo (Almeida et al., 2008). Interpretando-se o funcionamento da enzima como o de um canal iônico transportador do íon A^+ é utilizada a equação GHK (eq.(3.5)) para calcular a corrente. Neste caso, as concentrações do íon, derivadas a partir do esquema cinético, dependem das concentrações de sódio, cloreto, ATP, ADP e fosfatos (eqs.(3.22) e (3.23)). Uma observação importante diz respeito à dependência dessa corrente do PT, comprovada em vários estudos (Weer et al., 1988), mas não incluída explicitamente no esquema Albers-Post.

3.2.3 Co-transportes

Co-transportadores são proteínas integrais que realizam um carregamento eletroneutro simultâneo de dois ou mais íons. É um tipo de transporte ativo secundário, pois se utiliza dos gradientes eletroquímicos produzidos pela bomba- Na^+/K^+ . São dois os co-transportadores cátion-cloreto no modelo: K^+-Cl^- (KCC) e $Na^+-K^+-2Cl^-$ (NKCC). Há evidências de que controlam as concentrações intracelulares de Cl^- e extracelular de K^+ durante eventos neuronais com grandes movimentações iônicas. O KCC está presente principalmente em neurônios. Ele realiza o efluxo de Cl^- à custa da acumulação de K^+ intracelular pela Na^+/K^+ -ATPase (sob condições normais fisiológicas). O NKCC se encontra comumente em células gliais. Também sob condições normais fisiológicas, o NKCC promove o influxo iônico de Na^+ , K^+ e Cl^- (Payne, 1997; Russel, 2000). Veja as equações (3.24) e (3.25).

3.2.4 Trocadores

São proteínas integrais de membrana as quais promovem a troca simultânea de um par de ânions ou cátions, entre os meios intra e extracelular, num processo eletroneutro. Também é um tipo de transporte ativo secundário. Suas funções estão associadas à recuperação de gradientes iônicos transmembrânicos, regulação do volume celular e também controle de pH (Chesler, 2003). O modelo incorpora os trocadores Na^+/H^+ , K^+/H^+ e HCO_3^-/Cl^- , presentes no hipocampo, para obter uma condição de equilíbrio iônico intracelular durante o estado estacionário e também para regular as CIs (equações(3.26)-(3.28)).

3.2.5 Sistema de recaptção glial

Diversos mecanismos atuam cooperativamente para regular as concentrações de íons no ME. Em especial, a falha desses mecanismos para regular o excesso de $K^+]_o$ pode precipitar e sustentar atividades epileptiformes (seção 3.3; (Somjen, 2004)). Este excesso pode ser removido por meio da Na^+/K^+ -ATPase neuronal, por difusão e pela atuação das glias, quando os dois primeiros mecanismos são insuficientes. Glias regulam CIs usando transportadores ativos e/ou passivos presentes na sua membrana plasmática, como canais iônicos, bomba- Na^+/K^+ , cotransportadores e trocadores. O potássio capturado é então transportado pela rede de células glias, as quais são conectadas por GJs, para regiões onde $[K^+]_o$ é mais baixa. Tal conexão por GJs faz a rede de células glias atuarem como um quase-sincício² funcional e elétrico, pois as membranas plasmáticas mantêm a individualidade de suas células (Somjen, 2004; Somjen et al., 2008).

O modelo incorpora glias as quais contêm canais iônicos que se comportam passivamente (com permeabilidades constantes sob grandes variações dos potenciais de membrana). Além dos canais, agregaram-se a bomba- Na^+/K^+ , cotransportes cátion/cloreto e trocadores. Como aproximação, as glias não se conectam umas às outras e considera-se apenas uma glia para cada neurônio. Deste modo, o modelo AENS não incorpora uma rede de células glias.

3.3 Indução das atividades epileptiformes

O aumento da concentração de potássio na solução de perfusão, de 4 mM para 8 mM, induz atividade epileptiforme no modelo. Gradualmente, em cada unidade funcional, observa-se um aumento da $[K^+]_o$ e alteração das demais CIs devido ao surgimento de *bursts* epileptiformes. A indução depende do comportamento dos cotransportes KCC e NKCC e dos fluxos iônicos por canais e pela bomba- Na^+/K^+ . Sob CIs regulares, o KCC promove o efluxo de Cl^- contra o influxo devido ao NKCC. Aumentando $[K^+]_o$ a atividade de ambos cotransportadores aumenta. Entretanto, o influxo de Cl^- via NKCC supera o efluxo pelo KCC. O resultado líquido é um acúmulo de cloreto intracelular, o qual provoca despolarização neuronal porque muda o sentido da corrente de cloreto via canais iônicos, de uma corrente de entrada para uma de saída. Tal aumento de excitabilidade origina o *bursting*. Durante a fase ativa, ou período ictal, o influxo de Na^+ por canais dependentes de voltagem supera o efluxo via bomba- Na^+/K^+ . O aumento da $[Na^+]_i$ estimula a atuação da Na^+/K^+ -ATPase, a qual aumenta durante o período ictal. Há uma transição para o período interictal somente quando o efluxo de sódio pela bomba- Na^+/K^+ for maior do que o influxo via canais iônicos (Almeida et al., 2008). O diagrama da figura 3.4 apresenta um

²Sincício é uma massa formada por um conjunto de células, sem a separação individual por membranas plasmáticas, cujo comportamento corresponde a uma única unidade funcional.

resumo do funcionamento dos mecanismos de deflagração das atividades epileptiformes, sustentação e transição entre os períodos ictal e inter-ictal.

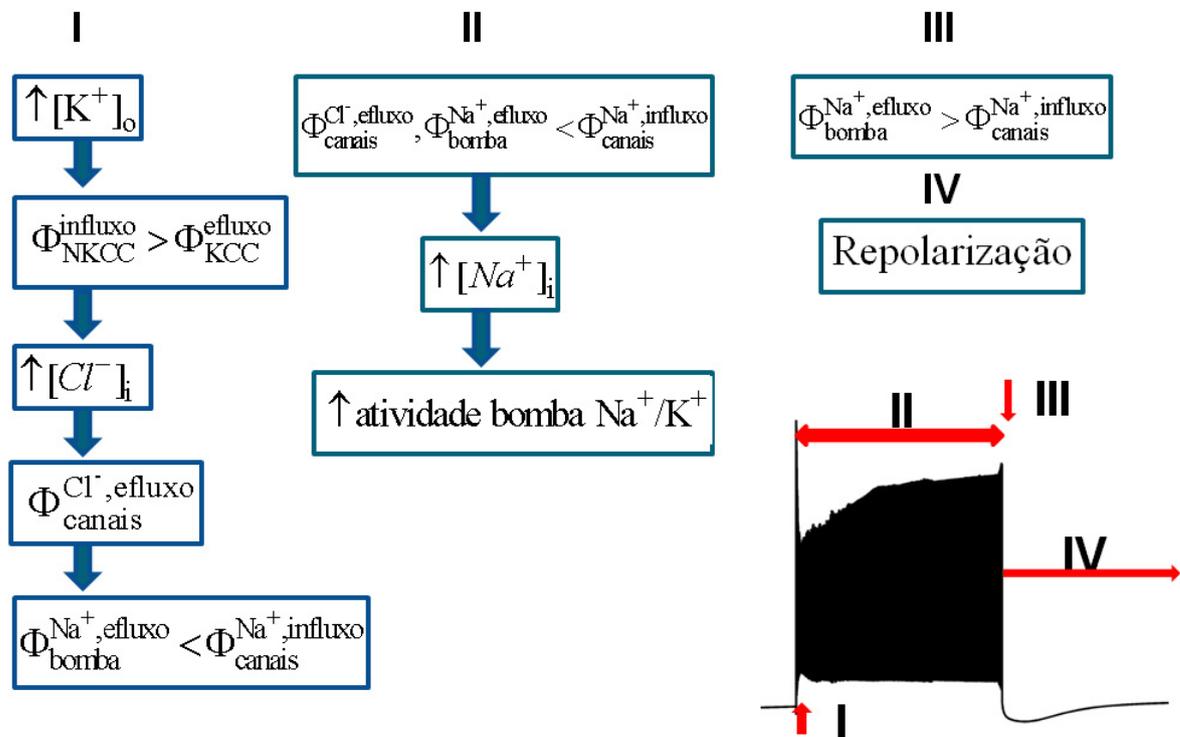


Figura 3.4: Diagrama esquemático dos mecanismos atuantes durante as fases do *burst* epileptiforme. Na fase (I) há deflagração de um *burst* ou a transição da fase interictal (ou fase silenciosa) para a fase ictal (ou fase ativa). (II) corresponde ao período ictal no qual há o disparo de uma seqüência de potenciais de ação induzido pela despolarização neuronal provocada pelo aumento de $[Cl^-]_i$. (III) sinaliza o término da fase ativa marcada pelo efluxo de Na^+ devido à bomba- Na^+/K^+ , superando o influxo de Na^+ via canais iônicos. Em (IV) segue o período inter-ictal, quando há a recuperação dos gradientes iônicos, repolarização neuronal e decréscimo da atividade da bomba- Na^+/K^+ .

Os demais mecanismos de transporte como os trocadores Na^+/H^+ , K^+/H^+ e HCO_3^-/Cl^- oferecem um ajuste às CIs, bem como o sistema de recaptção por glias, que retira os excessos do ME. Alguns autores têm sugerido que uma falha deste sistema, a qual pode favorecer um aumento excessivo da $[K^+]_o$, precipite o surgimento de crises epiléticas (Fröhlich et al., 2008a).

As figuras ?? traz uma comparação entre potenciais transmembrânicos e potenciais de campo extracelulares simulados e registrados experimentalmente, sob o protocolo alto- K^+ e zero- Ca^{2+}

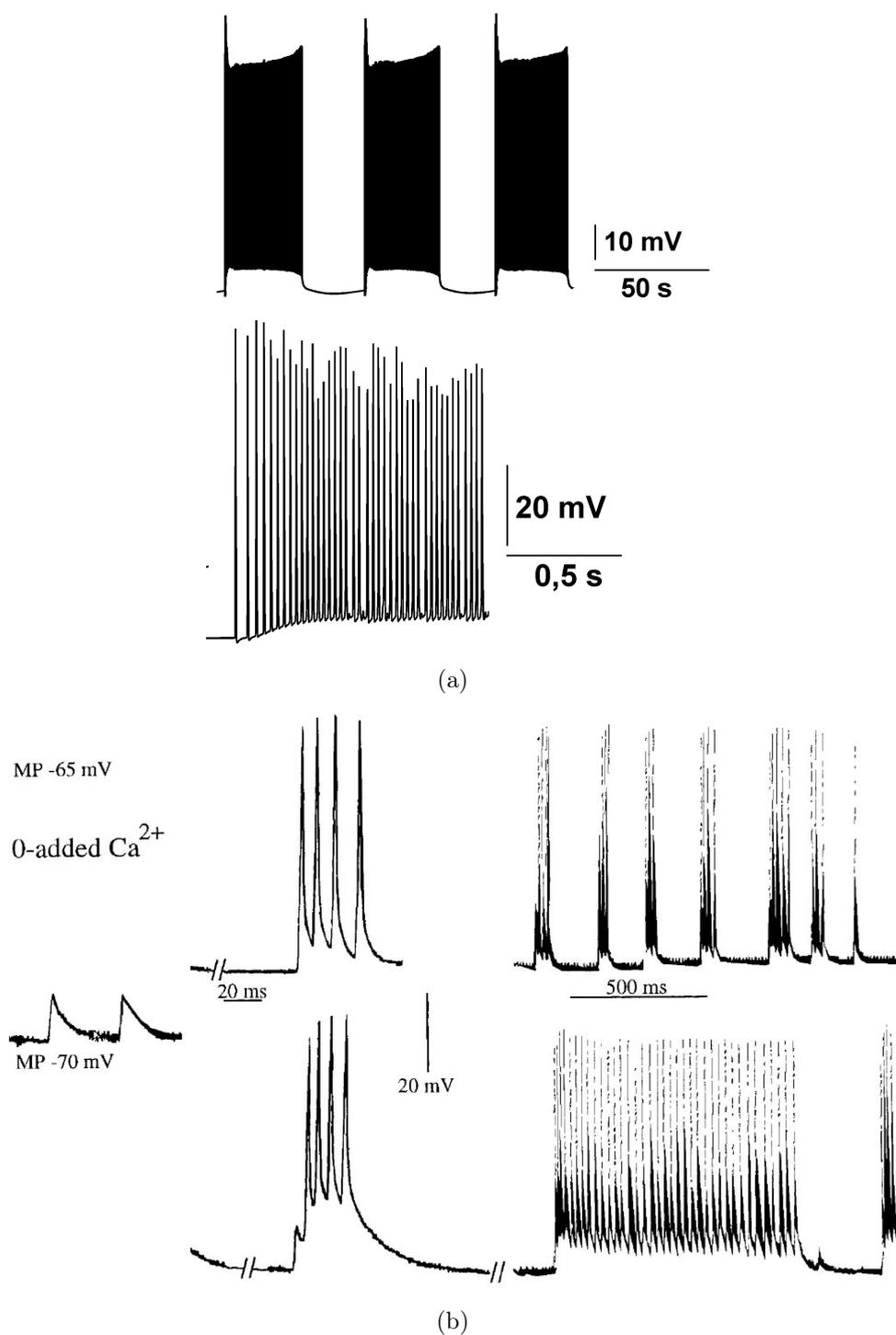


Figura 3.5: Potenciais transmembrânicos simulados (a) e registro experimental (b; extraído de (Pan e Stringer, 1997)).

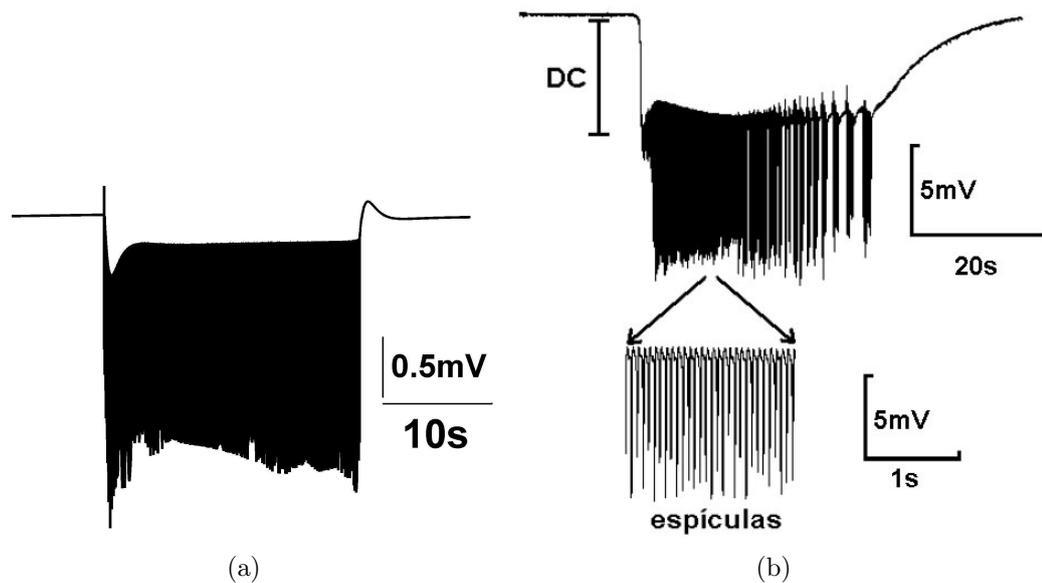


Figura 3.6: Potenciais de campo extracelulares simulados (a) e registro experimental (b; extraído de (Rodrigues, 2003)).

3.4 Interações não-sinápticas

As conexões não-sinápticas representadas no modelo compreendem o acoplamento por GJs, efeito de campo elétrico populacional e variação de CIs extracelulares. As interações não-sinápticas operam em escalas de tempo distintas, representadas na figura 3.7. Nesta figura, cada traço representa o intervalo entre o menor tempo de latência e o maior tempo de duração para os efeitos sobre *population spikes* observados experimentalmente (Rodrigues, 2003).

3.4.1 *Gap junctions*

Numa conexão por GJ os citoplasmas dos neurônios participantes estão conectados permitindo a passagem de íons, guiada por gradientes eletroquímicos. Desta forma, é possível modelar os fluxos iônicos por GJs usando um processo eletrodifusivo, assumindo-se o campo elétrico constante no interior do conduto. Assim, a equação de GHK de corrente (Hille, 2001) descreve esses fluxos no modelo (eq.(3.5)). Note que cada neurônio se conecta ao seu primeiro vizinho por uma GJ, resultando num mínimo de três conexões por neurônio da rede (figura 3.2). O parâmetro k_{GJ} regula a intensidade do acoplamento e multiplica todas as permeabilidades nas GJs da mesma maneira (capítulo 5). As mudanças de acoplamento simulam condições que alteram as permeabilidades via GJs, tais como acidificação do MI ou uso de bloqueadores (Perez-Velazquez e Carlen, 2000; Perez-Velazquez et al., 1994).

Nos modelos teóricos para descrição de atividades neuronais, o uso da Lei de Ohm para descrever a corrente por GJs é muito comum. Nesses casos, não se considera a variação

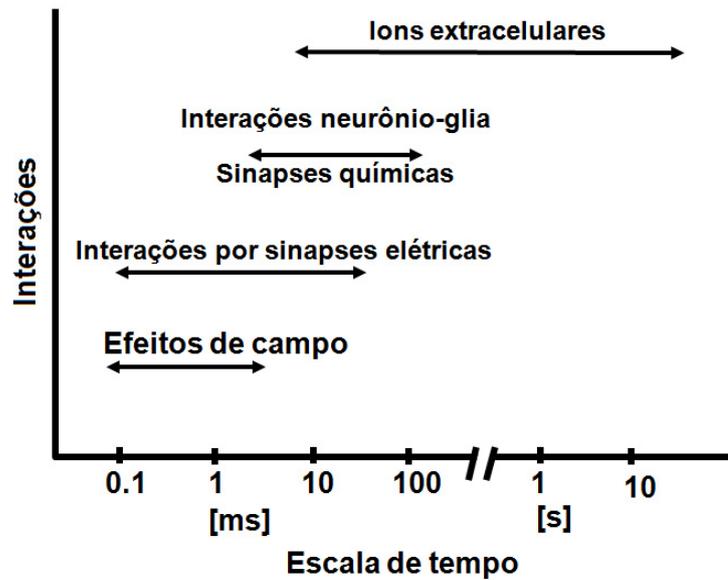


Figura 3.7: Diagrama esquemático das escalas de tempo nas quais operam os mecanismos de comunicação neural, sejam sinápticos ou não-sinápticos. Cada traço representa o intervalo entre o menor tempo de latência e o maior tempo de duração para os efeitos sobre *population spikes* observados experimentalmente (modificado de (Rodrigues, 2003)).

das CIs, sendo suficiente usar uma descrição que leva em conta apenas diferenças de potencial. Contudo, durante atividades epileptiformes não-sinápticas as variações de CI são intensas; portanto é necessário incorporá-las com o uso da equação GHK de corrente, como se faz no modelo (eq.(3.5)).

3.4.2 Efeito de campo elétrico

Quando um neurônio dispara potenciais de ação correntes iônicas são geradas no ME. Tais correntes contribuem para produzir o potencial extracelular que influencia diretamente os PTs das células vizinhas, alterando sua excitabilidade. O cálculo deste potencial extracelular (eqs.(3.16)-(3.18),(3.19),(3.20)) usa uma modificação da Lei de Ohm considerando n fontes de corrente pontuais, com origem nos neurônios da vizinhança contribuindo para o potencial extracelular em um dado ponto de observação. O ME é considerado isotrópico, homogêneo e puramente resistivo (Nunez e Srinivasan, 2005; Varona et al., 2000). Este potencial extracelular populacional produz uma corrente que altera o PT neuronal, dada pela equação (3.20).

A resistividade do tecido não é estática, mas se altera com a geometria do ME, particularmente com mudanças de volume (Jefferys, 1995). Durante grandes movimentações iônicas, os volumes neuronais mudam em resposta a uma variação de pressão osmótica, provocando reduções ou expansões do volume extracelular. Isto leva a uma variação da resistividade do tecido, na qual diminuições do volume extracelular correspondem a aumentos de resistividade (Fox et al., 2004), e sendo assim, ela é uma função decrescente do

volume extracelular (eq.(3.18); detalhes na seção 3.5.6).

3.4.3 Variação das concentrações iônicas

As variações temporais das concentrações extracelulares de sódio, potássio e cloreto influenciam os padrões de atividade neuronal, pois atuam sobre os mecanismos de transporte iônico. Logo, alteram as CIs intracelulares e, por sua vez, os PTs. Um exemplo clássico (Fröhlich et al., 2008b), discutido na seção 3.3, é a elevação da $[K^+]_o$, a qual leva ao aumento de excitabilidade neuronal e dos fluxos iônicos dos cotransportadores KCC e NKCC. Deste modo, devido às atividades neuronais induzidas pelo aumento da $[K^+]_o$, alteram-se as concentrações intracelulares de Na^+ e Cl^- , o que pode levar a um reforço na despolarização, modificação dos fluxos via bomba- Na^+/K^+ e a uma modificação dos volumes celulares, causada por efeitos osmóticos (Lang et al., 1998; Somjen, 2004).

No ME, as modificações das CIs se devem principalmente à eletrodifusão, descrita pela equação de Nernst-Planck (eq.(3.15)). A eletrodifusão pode ser modulada alterando-se características estruturais do ME, tais como fração de volume, tortuosidade e recaptção não-específica de espécies químicas. Escolhemos modular a eletrodifusão alterando a tortuosidade, a qual representa um impedimento à difusão devido a obstáculos, originários de obstruções celulares, aprisionamento transiente em micro-espacos vazios, interações com outras espécies químicas, dentre outros (Hrabítová e Nicholson, 2007; Syková, 2004; Syková e Nicholson, 2008). Definimos a tortuosidade, designada por λ , pela relação entre os coeficientes de difusão livre (D) e efetivo (D^*): $\lambda = \sqrt{D/D^*}$. Este parâmetro pode ser alterado por intervenções locais ou sistêmicas, envelhecimento, trauma ou condições patológicas (Syková e Nicholson, 2008). Valores de λ medidos em diversas regiões do cérebro, variam entre 1,4 e 2,4 (Hrabítová e Nicholson, 2007; Syková e Nicholson, 2008). Tais valores podem ser considerados fisiológicos, pois são determinados usando-se intervenções locais ou sistêmicas, como por exemplo, sob indução de hipóxia (Syková e Nicholson, 2008).

Medidas de tortuosidade pelo método TMA⁺-iontoforético (Hrabítová e Nicholson, 2007) revelaram que a camada granular do GD do hipocampo de ratos saudáveis possui tortuosidade anisotrópica, o que corresponde a valores distintos de λ medidos para cada um dos três eixos principais no tecido, uma consequência da sua estrutura anatômica local (Syková e Nicholson, 2008). O modelo assume que a camada granular do GD é isotrópica e o ME homogêneo. Consequentemente, a tortuosidade do ME é uma constante (Nicholson, 2001).

3.5 Descrição matemática

O conjunto de equações a seguir descreve a evolução temporal dos PTs, concentrações e fluxos em uma dada unidade funcional. Portanto, cada uma das variáveis dinâmicas é função da posição de um dado compartimento celular da rede

3.5.1 Potencial transmembrânico

O PT neuronal depende do somatório das correntes iônicas produzidas pelos mecanismos de transporte iônico, por GJs e pelo efeito de campo. O que difere essa descrição do formalismo de Hodgkin-Huxley (Hodgkin e Huxley, 1952) é o cálculo das correntes iônicas via canais, que usa a equação GHK para incluir a dependência das concentrações iônicas.

$$C_m \frac{dV}{dt} = -(I_{Na,tot} + I_{K,tot} + I_{Cl,tot} + I_{GJ} + I_{EC}) \quad (3.1)$$

C_m é a capacitância por unidade de área da membrana (em μFcm^{-2} , onde F é a constante de Faraday (tabela 3.1)³ e V_m é o PT neuronal em mV (todos os potenciais a seguir são dados em mV). As correntes⁴ iônicas totais são dadas por:

$$I_{Na,tot} = I_{Na,t} + I_{Na,p} + 3I_{Na^+/K^+-ATPase} + F\Phi_{NKCC} + F\Phi_{Na,troc} + I_{Na,vaz} \quad (3.2)$$

$$I_{K,tot} = I_{K,rt} + I_{K,A} - 2I_{Na^+/K^+-ATPase} + F\Phi_{NKCC} + F\Phi_{KCC} + F\Phi_{K,troc} + I_{K,vaz} \quad (3.3)$$

$$I_{Cl,tot} = I_{Cl,volt} + I_{Cl,const} - 2F\Phi_{NKCC} - F\Phi_{KCC} - F\Phi_{Cl,troc} + I_{Cl,vaz} \quad (3.4)$$

A corrente total de sódio, $I_{Na,tot}$, eq.(3.2), depende das correntes pelos canais iônicos ($I_{Na,t}$ e $I_{Na,p}$), pela bomba- Na^+/K^+ , $I_{Na^+/K^+-ATPase}$. Também depende dos fluxos pelos cotransporte NKCC (Φ_{NKCC}) e pelo trocador Na^+/H^+ ($\Phi_{Na,troc}$). As correntes e fluxos pelos canais iônicos ($I_{K,rt}$ e $I_{K,A}$), pela Na^+/K^+ -ATPase, cotransportes (Φ_{NKCC} e Φ_{KCC}) e trocador Na^+/H^+ ($\Phi_{K,troc}$) compõem a corrente total de potássio, $I_{K,tot}$, eq.(3.3).

Finalmente, a corrente total de cloreto, $I_{Cl,tot}$, eq.(3.4), é a soma das correntes por canais iônicos ($I_{Cl,volt}$ e $I_{Cl,const}$), cotransportes e pelo trocador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ ($\Phi_{Cl,troc}$). I_{GJ} e I_{EC} são as correntes pelas GJs e pelo efeito de campo elétrico. As correntes de vazamento ($I_{K,vaz}, I_{Na,vaz}, I_{Cl,vaz}$), as quais regulam o potencial de repouso, são constantes (tabela 3.4). Expressam-se as densidades totais de corrente em mA/cm^2 e as densidades de fluxo em $\text{mmol}/\text{s}\cdot\text{cm}^2$.

³A conversão entre fluxos e correntes se dá pela relação $F\Phi=I$, onde F é a constante de Faraday

⁴Os termos corrente e fluxo na verdade se referem a densidades de corrente e de fluxo.

3.5.2 Equação GHK de corrente

A equação GHK descreve os fluxos pelos canais, GJs e pela bomba- Na^+/K^+ :

$$\Phi_{C,L} = P_{C,L} \frac{(z_C F)^2}{RT} \Delta V \frac{[C]_i e^{z_C F \Delta V / RT} - [C]_o}{e^{z_C F \Delta V / RT} - 1} \quad (3.5)$$

$\Phi_{C,L}$ é o fluxo associado ao íon C (Na^+ , K^+ , Cl^-) entre os compartimentos intracelulares i e j, devida ao mecanismo de transporte L. $P_{C,L}$ é a permeabilidade associada ao íon C e ao mecanismo de transporte L. ΔV a diferença de potencial entre os compartimentos i e j, $[C]_{i,j}$ a concentração do íon C (em mM) no compartimento i ou j, z_C a valência do íon C, R a constante dos gases, F a constante de Faraday e T a temperatura em Kelvin (tabela 3.1).

3.5.3 Concentrações iônicas intra e extracelulares

As CIs no intracelular de neurônios e no ME, em uma unidade funcional, variam no tempo de acordo com as expressões:

$$\frac{\partial [C]_i}{\partial t} = -\Phi_C - \Phi_{C,GJ} \quad (3.6)$$

$$\frac{\partial [C]_o}{\partial t} = \Phi_C + \left(\frac{\partial [C]_o}{\partial t} \right)_{edif} - \Phi_C^{glia} \quad (3.7)$$

$$\Phi_{Na,tot} = \Phi_{Na,t} + \Phi_{Na,p} + \Phi_{NKCC} + 3\Phi_{Na^+/K^+-ATPase} + \Phi_{Na,troc} + \Phi_{Na,GJ} + \Phi_{Na,vaz} \quad (3.8)$$

$$\Phi_{K,tot} = \Phi_{K,rt} + \Phi_{K,A} + \Phi_{KCC} + \Phi_{NKCC} - 2\Phi_{Na^+/K^+-ATPase} + \Phi_{K,troc} + \Phi_{K,GJ} + \Phi_{K,vaz} \quad (3.9)$$

$$\Phi_{Cl,tot} = \Phi_{Cl,volt} + \Phi_{Cl,const} + \Phi_{KCC} + 2\Phi_{NKCC} + \Phi_{Cl,troc} + \Phi_{Cl,GJ} + \Phi_{Cl,vaz} \quad (3.10)$$

As CIs intracelulares dependem dos fluxos pelos canais iônicos ($\Phi_{Na,t}$, $\Phi_{Na,p}$, $\Phi_{K,rt}$, $\Phi_{K,A}$, $\Phi_{Cl,volt}$, $\Phi_{Cl,const}$), bomba Na^+/K^+ ($\Phi_{Na^+/K^+-ATPase}$), demais transportadores de íons (Φ_{KCC} , Φ_{NKCC} , $\Phi_{Na,troc}$, $\Phi_{K,troc}$, $\Phi_{Cl,troc}$) e GJs ($\Phi_{ion,GJ}^5$; ver seção (3.5.1)). Os fluxos de vazamento ($\Phi_{ion,vaz}$), os quais estabilizam os valores das CIs no repouso são constantes. Note que o sentido é do MI para o ME e, portanto a concentração intracelular diminui com o aumento dos fluxos iônicos. As concentrações extracelulares, por sua vez, aumentam com o acréscimo dos mesmos fluxos iônicos, também dependendo dos fluxos produzidos pelas glias, eq.(3.11) e da eletrodifusão no ME, eq.(3.15).

3.5.4 Concentrações e fluxos nas glias

As CIs nas glias evoluem de acordo com as equações:

⁵ion = Na^+ , K^+ , Cl^-

$$\frac{\partial [C]_i^{glia}}{\partial t} = -\Phi_C^{glia} \quad (3.11)$$

$$\Phi_{Na,tot}^{glia} = \Phi_{Na,c}^{glia} + 3\Phi_{Na^+/K^+-ATPase}^{glia} + \Phi_{NKCC}^{glia} + \Phi_{Na,troc}^{glia} + \Phi_{Na,vaz}^{glia} \quad (3.12)$$

$$\Phi_{K,tot}^{glia} = \Phi_{K,c}^{glia} + \Phi_{K,ir}^{glia} + \Phi_{KCC}^{glia} + \Phi_{NKCC}^{glia} - 2\Phi_{Na^+/K^+-ATPase}^{glia} + \Phi_{K,troc}^{glia} + \Phi_{K,vaz}^{glia} \quad (3.13)$$

$$\Phi_{Cl,tot}^{glia} = \Phi_{Cl,c}^{glia} + \Phi_{KCC}^{glia} + 2\Phi_{NKCC}^{glia} + \Phi_{Cl,troc}^{glia} + \Phi_{Cl,vaz}^{glia} \quad (3.14)$$

Os fluxos pelos canais iônicos ($\Phi_{Na,c}^{glia}$, $\Phi_{K,c}^{glia}$, $\Phi_{K,ir}^{glia}$, $\Phi_{Cl,c}^{glia}$), bomba de sódio-potássio glial (bomba- $Na^+/K^+-ATPase$), cotransportadores NKCC e KCC glias (Φ_{KCC}^{glia} , $2\Phi_{NKCC}^{glia}$) e trocadores glias ($\Phi_{Na,troc}^{glia}$, $\Phi_{K,troc}^{glia}$, $\Phi_{Cl,troc}^{glia}$) regulam as CIs nas glias. Os fluxos de vazamento ($\Phi_{ion,vaz}^{glia}$), também estabilizam as CIs glias no repouso. As equações que descrevem os fluxos iônicos neuronais via canais, cotransportadores, trocadores e bomba também descrevem fluxos glias.

3.5.5 Eletrodifusão

A equação (3.15) expressa a variação de CIs devida à eletrodifusão no ME:

$$\left(\frac{\partial [C]_o}{\partial t}\right)_{edif} = \frac{D_C}{\lambda^2} \left[\nabla^2 [C]_o + \frac{z_C F}{RT} (\nabla [C]_o \cdot \nabla V_o + [C]_o \cdot \nabla^2 V_o) \right] \quad (3.15)$$

$[C]_o$ é concentração do íon C no ME, D_C o coeficiente de difusão do íon C, z_C a valência do íon C, λ a tortuosidade, R a constante dos gases, F a constante de Faraday e T a temperatura em Kelvin (tabelas 3.1). V_o é o potencial extracelular, numa dada unidade funcional, produzido pela contribuição dos gradientes de CI e do potencial.

3.5.6 Potencial extracelular

$$\nabla V_o = -\frac{RT}{F} \left(\frac{z_{Na} D_{Na} \nabla [Na^+]_o + z_K D_K \nabla [K^+]_o + z_{Cl} D_{Cl} \nabla [Cl^-]_o}{z_{Na}^2 D_{Na} [Na^+]_o + z_K^2 D_K [K^+]_o + z_{Cl}^2 D_{Cl} [Cl^-]_o} \right) + \nabla V_{extra,f} \quad (3.16)$$

O primeiro termo na equação (3.16) representa a geração de campo elétrico devido aos gradientes das CIs extracelulares (Almeida et al., 2004). O segundo termo, o gradiente de $V_{extra,f}$, é devido às correntes dos potenciais de ação de todos os neurônios da rede:

$$V_{extra,f} = \tau \sum_{i=1}^N \frac{1}{d_i} (I_{Na,p} + I_{Na,t} + I_{IK,rt} + I_{K,A}) \quad (3.17)$$

d_i é a distância entre o neurônio e a i -ésima fonte de corrente (em cm), N é o número de fontes de corrente na rede (igual ao número total de unidades funcionais) e τ é parâmetro que mede a resistividade do tecido (em $mV \cdot cm^3 / mA$) nas vizinhanças de um dado

neurônio, uma função do volume extracelular (Almeida et al., 2008):

$$\tau = \delta \left[1 + c \left(1 - \frac{1}{1 + e^{((-Vol_{extra}-a)/b)}} \right) \right] \quad (3.18)$$

Vol_{extra} é o volume extracelular em μm^3 , $\delta = 6,25 \times 10^{-3} \text{ mV} \cdot \text{cm}^{-3} / \text{mA}$, $a = 2,97 \times 10^{-13} \text{ dm}^{-3}$, $b = 6,0 \times 10^{-16} \text{ dm}^{-3}$, $c = 15$. Os parâmetros a , b , c e δ são fenomenológicos, ajustáveis para observação de uma faixa de amplitudes dos *population spikes*.

Nos modelos para condução elétrica em materiais (metais e eletrólitos) a resistividade é inversamente proporcional à densidade de portadores; portanto, se o número e a mobilidade dos portadores se mantém, quanto maior o volume do condutor, maior a resistividade (Ashcroft e Mermin, 1976). Na equação (3.18) a relação entre resistividade do tecido e volume extracelular é inversa. Podemos entender a origem dessa relação: 1) lembrando que a condução no tecido vivo ocorre numa escala espacial muito superior à da condução em materiais; 2) interpretando o tecido como uma suspensão de corpos isolantes (por aproximação) imersos em um fluido eletrolítico. A equação de Maxwell-Rayleigh fornece a razão entre as resistividades da suspensão e do fluido como função do volume ocupado pelo fluido (Nunez e Srinivasan, 2005):

$$\frac{\eta_s}{\eta_f} = \frac{vol_{total}(i + h) - h vol_f}{vol_f} \quad (3.19)$$

h é um fator de geometria dos corpos, vol_{total} é o volume total da suspensão, vol_f é o volume do fluido e η_f é a resistividade do fluido. Nesta equação, a resistividade da suspensão (η_s) diminui com o aumento de vol_f . A função sigmoideal na eq.(3.18) reproduz o decaimento da resistividade do tecido com o aumento do volume ocupado pelo fluido condutor (volume do ME) e também reflete um ajuste fenomenológico para que a simulação reproduzisse as amplitudes dos *population spikes* dos registros experimentais.

3.5.7 Efeito de campo elétrico

Estimou-se a corrente produzida pelo efeito de campo, I_{EC} , na qual o parâmetro ε , a condutância do ME (em $\text{mA}/\text{mV} \cdot \text{m}^2$; tabela 3.2) controla a intensidade do efeito de campo:

$$I_{EC} = \varepsilon V_{extra,f} \quad (3.20)$$

3.5.8 Potencial de campo extracelular

$$V_{EFP} = - \int_{\zeta} \nabla V_o \cdot dl \quad (3.21)$$

O potencial de campo extracelular medido por um microeletrodo é a integral de caminho do campo elétrico extracelular, onde ζ é a trajetória que conecta a ponta do eletrodo a um ponto remoto na solução de perfusão. A ponta do eletrodo se localiza em uma determinada unidade funcional da rede.

3.5.9 Concentração do íon fictício gerado pela bomba- Na^+/K^+

Como vimos na seção 3.2.2, o transporte de três íons Na^+ para cada dois íons K^+ produz uma corrente carregada pelo íon virtual A^+ . Considerando que o transportador funciona, efetivamente, como um canal iônico dependente de voltagem, utiliza-se a equação GHK, eq.(3.5), para calcular a corrente. Da cinética do transporte iônico, correspondente ao ciclo de Albers-Post (Horisberger, 2004) escrevemos as equações a seguir para o cálculo das concentrações de A^+ :

$$[A_i^+] = \left[\frac{K_A^i C_{ENa,K}^{m,total} [ATP]_i}{[ATP]_i + K_{ATP}^i \left(1 + \frac{[ADP]_i C_P^i}{K_{ADP,P}^i} \right)} \right] \times \left[\frac{[Na^+]_i}{[Na^+]_i + K_{Na}^i \left(1 + \frac{[K^+]_i}{K_K^i} \right)} \right]^3 \times \left[\frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + K_K^o \left(1 + \frac{[Na^+]_o}{K_{Na}^o} \right)} \right]^2 \quad (3.22)$$

$$[A_o^+] = \left[\frac{K_A^o C_{ENa,K}^{m,total} [ADP]_i [P]_i}{[ADP]_i [P]_i + K_{ADP,P}^i \left(1 + \frac{[ATP]_i}{K_{ATP}^i} \right)} \right] \times \left[\frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_o + K_{Na}^o \left(1 + \frac{[K^+]_o}{K_K^o} \right)} \right]^3 \times \left[\frac{[K^+]_i}{[K^+]_i + K_K^i \left(1 + \frac{[Na^+]_i}{K_{Na}^i} \right)} \right]^2 \quad (3.23)$$

$C_{ENa,K}^{m,total}$ é a concentração total de enzimas Na^+/K^+ -ATPase e $K_{w,pump}^{face}$ é a constante de equilíbrio nas faces intra ou extracelulares para $w = \text{ADP}, \text{P}, \text{ATP}, \text{A}^+, \text{Na}^+$ e K^+ .

3.5.10 Fluxo pelo cotransporte KCC

O fluxo pelo cotransporte KCC é calculado considerando um conjunto de reações que descrevem a ligação conjunta dos íons com a enzima cotransportadora, formação de complexos intermediários, os quais realizam o transporte pela membrana e, finalmente, a

liberação dos íons para a face oposta. Os fluxos pelo NKCC e trocadores são calculados usando um grupo de reações enzimáticas.

$$\Phi_{KCC} = \frac{Q_{KCC}[K^+]_i[Cl^-]_i}{\left([K^+]_i + K_{K,KCC}^i \left(1 + \frac{[K^+]_o}{K_{K,KCC}^o}\right)\right) \left([Cl^-]_i + K_{Cl,KCC}^i \left(1 + \frac{[Cl^-]_o}{K_{Cl,KCC}^o}\right)\right)} - \frac{Q_{KCC}[K^+]_o[Cl^-]_o}{\left([K^+]_o + K_{K,KCC}^o \left(1 + \frac{[K^+]_i}{K_{K,KCC}^i}\right)\right) \left([Cl^-]_o + K_{Cl,KCC}^o \left(1 + \frac{[Cl^-]_i}{K_{Cl,KCC}^i}\right)\right)} \quad (3.24)$$

$K_{w,KCC}^{face}$ é a constante de equilíbrio nas faces intra ou extracelulares. $w = Na^+$ e K^+ e Cl^- .

3.5.11 Fluxo pelo cotransporte NKCC

$$\Phi_{NKCC} = Q_{NKCC} \left([Na^+]_i [K^+]_i [Cl^-]_i^2 - [Na^+]_o [K^+]_o [Cl^-]_o^2 \right) / \left\{ \left([Na^+]_i + [Na^+]_o + K_{Na,NKCC} \right) \left([K^+]_i + [K^+]_o + K_{K,NKCC} \right) \left([Cl^-]_i + [Cl^-]_o + K_{Cl,NKCC} \right)^2 \right\} \quad (3.25)$$

$K_{w,NKCC}^{face}$ é a constante de equilíbrio nas faces intra ou extracelulares para $w = Na^+$ e K^+ e Cl^- .

3.5.12 Fluxos pelos trocadores

$$\Phi_{Na,troc} = Q_{Na/H} \frac{[Na^+]_i}{[Na^+]_i + K_{Na,exch} \left(1 + \frac{[K^+]_i}{K_{K,exch}}\right)} \quad (3.26)$$

$$\Phi_{K,troc} = Q_{Na/H} \frac{[K^+]_i}{[K^+]_i + K_{K,exch} \left(1 + \frac{[Na^+]_i}{K_{Na,exch}}\right)} \quad (3.27)$$

$$\Phi_{Cl,troc} = Q_{HCO_3/Cl} \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_i + K_{Cl,exch}} \quad (3.28)$$

$K_{w,exch}$ é a constante de equilíbrio para $w = Na^+$ e K^+ e Cl^- .

3.5.13 Volume celular

As variações de volume celular (neurônios e glias) e extracelular ocorrem por causa das alterações das CIs, resultando em variações da pressão osmótica:

$$\frac{dVol_{in,neur}}{dt} = \nu \left(\sum_C [C]_o + [S]_i - \sum_C [C]_i + [S]_o \right), \quad (3.29)$$

$$Vol_{extra} = Vol_{total,const} - Vol_{in,neur}$$

$Vol_{in,neur}$ é o volume de um neurônio, Vol_{extra} é o volume do ME e $Vol_{total,const}$ é o volume total de uma unidade funcional, todos em dm^3 . Ainda: $[S]_i = n_i^S / Vol_{in,neur}$ e $[S]_o = n_o^S / Vol_{in,neur}$, são as concentrações de solutos impermeantes (em mM), onde n_i^S e n_o^S (em mmol) representam as frações desses solutos nos meios intra e extracelular, respectivamente. Nesta descrição, ν é o parâmetro que controla a taxa de variação do volume neuronal. Note que na equação (3.29) impôs-se o vínculo: o volume total de uma unidade funcional, um compartimento intracelular, é sempre constante.

3.5.14 Permeabilidades e variáveis de *gating* do tipo Hodgkin-Huxley

As permeabilidades iônicas dependem das variáveis de *gating* m , n , h , w , a , b , as quais obedecem equações do tipo:

$$\frac{1}{\tau_z(V_m)} \frac{dz}{dt} = (z_\infty(V_m) - z) = \alpha_z(V_m)(1 - z) - \beta_z(V_m)z \quad (3.30)$$

As expressões para permeabilidades e taxas de transição nos neurônios granulares são as seguintes:

1. Correntede sódio transiente

$$P_{Na,t} = \bar{P}_{Na,t} m^3 h \quad (3.31)$$

$$\alpha_m = - \frac{0,1(V_m + 40,8)}{\exp(-0,1(V_m + 40,8)) - 1} \quad (3.32)$$

$$\beta_m = 4 \exp(-(V_m + 65,8)/18) \quad (3.33)$$

$$\alpha_h = 0,07 \exp(-(V_m + 65,8)/20) \quad (3.34)$$

$$\beta_h = \frac{1}{\exp(0,1(-V_m + 35,8)) + 1} \quad (3.35)$$

2. Corrente de sódio persistente

$$P_{Na,p} = \bar{P}_{Na,p} w \quad (3.36)$$

$$w_{\text{inf}} = \frac{0,1}{\exp(-(V_m + 53)/2) + 1}, \tau_w = 30 \quad (3.37)$$

3. Corrente de potássio retificadora com atraso

$$P_{IK,rt} = P_I^{max} K_{rt} n^4 \quad (3.38)$$

$$\alpha_n = -\frac{0,001(V_m + 55,8)}{\exp(-0,1(V_m + 55,8)) - 1} \quad (3.39)$$

$$\beta_n = 0,0125 \exp(-(V_m + 65,8)/80) \quad (3.40)$$

4. Corrente de potássio do tipo A

$$P_{K,A} = \bar{P}_{K,A} a^3 b \quad (3.41)$$

$$\alpha_a = -\frac{0,05(V_m + 40,0)}{\exp(-(V_m + 40,0)/15) - 1} \quad (3.42)$$

$$\beta_a = \frac{0,1(V_m + 50,0)}{\exp((V_m + 50,0)/8) - 1} \quad (3.43)$$

$$\alpha_b = \frac{1,5 \cdot 10^{-5}}{\exp((V_m - 2)/15)} \quad (3.44)$$

$$\beta_b = \frac{0,06}{\exp(-(V_m + 33,0)/12) + 1} \quad (3.45)$$

5. Corrente de cloreto voltagem-dependente

$$P_{C,volt} = \bar{P}_{Cl,volt} \left(1 + \exp \left(-1,28 \frac{V_m + 18,1}{0,05424T} \right) \right) \quad (3.46)$$

Nas células gliais as permeabilidades iônicas dos canais para sódio e cloreto, constantes, foram ajustadas para reproduzir o potencial de repouso observado em tais células (Pan e Stringer, 1996). O canal para potássio com retificação de entrada, cuja função está envolvida na remoção do excesso de $[K^+]_o$, tem permeabilidade descrita pela expressão (Rodrigues, 2003):

$$P_{Kr} = c_{P_{Kr}} / (1 + \exp((V_{glia} - E_K + 14,2)/33,3)) \quad (3.47)$$

onde $c_{P_{Kr}} = 0,65$ cm/s é uma constante de escala em cm/s, V_{glia} é o PT glial (em mV) e E_K o potencial de Nernst para o potássio, dado por $E_K = \frac{RT}{F} \ln([K^+]_o/[K^+]_i)$ (em mV).

A permeabilidade total dos canais para potássio gliais é dada pela soma da contribuição retificadora de entrada e de uma permeabilidade constante, responsável pelo domínio do potencial de Nernst do potássio sobre o PT glial.

Tabela 3.1: Constantes

Constante			Referência/ Observação
C_m	Capacitância do soma	$1,0 \mu\text{Fcm}^{-2}$	(1)
F	Constante de Faraday	96,487 C/mmol	(1)
R	Constante dos gases	8,314 mV.C/K.mmol	(1)
T	Temperatura	210,6 K	(2)
D_{Na}	Coefficiente de difusão de Na^+	$1,33 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$	(1)
D_K	Coefficiente de difusão de K^+	$1,96 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$	(1)
D_{Cl}	Coefficiente de difusão de Cl^-	$2,03 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$	(1)
Δt	Passo de tempo	0,1 ms	(3)
r	Raio celular (soma de neurônio granular ou célula glial)	20 μm	(4)
$\Delta x = \Delta y = \Delta z$	Comprimento de uma unidade funcional	20 μm	(4)

(1) (Hille, 2001); (2) Temperatura fisiológica; (3) Parâmetro ajustado de modo a reduzir o erro numérico (veja (Rodrigues, 2003)); (4) Diâmetro médio de corpos celulares de neurônios (Kandel et al., 2003).

Tabela 3.2: Permeabilidades iônicas

Parâmetro			Referência
$\bar{P}_{Na,t}$	Corrente transiente de Na^+ (max)	$7,78 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$	(1)
$\bar{P}_{Na,p}$	Corrente persistente de Na^+ (max)	$7,2 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$	(1)
$\bar{P}_{K,A}$	Corrente de K^+ do tipo A (max)	$3,6 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$	(1)
$\bar{P}_{Cl,volt}$	Corrente de Cl^- voltagem-dependente (max)	$1,08 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$	(1)
$P_{Cl,const}$	Corrente de Cl^- (constante)	$3,6 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$	(1)
P_A	Íon fictício A^+ (bomba- Na^+/K^+ neural)	$2,04 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$	(1)
$P_{Na,GJ}$	Na^+ nas GJs	$6,73 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$	(2)
$P_{K,GJ}$	K^+ nas GJs	$9,92 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$	(2)
$P_{Cl,GJ}$	Cl^- nas GJs	$1,84 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$	(2)
P_{Na}^{glia}	Corrente de Na^+ glial	$1,0 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$	(3)
P_K^{glia}	Corrente de K^+ glial	$1,08 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$	(3)
P_{Cl}^{glia}	Corrente de Cl^- glial	$2,50 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$	(3)
P_A^{glia}	Íon fictício A^+ (bomba- Na^+/K^+ glial)	$2,04 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$	(3)

(1) Parâmetros ajustados para reprodução das AEs, baseados nas observações experimentais realizadas no LANEC-UFSJ e/ou nos trabalhos seguintes: (Pan e Stringer, 1996; Xiong e Stringer, 2001).

(2) Parâmetros ajustados para reproduzir os dados experimentais em (MacVicar e Dudek, 1982).

(3) Idem, para reproduzir o potencial de repouso típico de células gliais (veja (Pan e Stringer, 1996)).

3.6 Implementação do modelo AENS

O modelo AENS foi implementado na linguagem de programação FORTRAN 90, usando-se o método de Euler (Press et al., 1992), com passo de integração igual a 10^{-4} s, para resolver as equações diferenciais ordinárias. Para as equações diferenciais parciais, empregou-se o método de diferenças finitas, calculando-se gradientes e laplacianos sobre a malha tridimensional correspondente à rede de compartimentos. Os cálculos foram feitos em computadores com processadores Intel Quad Core Xeon E5430 (2.66 GHz, 2x6 MB Ca-

Tabela 3.3: Parâmetros relacionados aos cotransportes, trocadores e bomba- Na^+/K^+

Parâmetro		Referência
K_A^o/K_A^i	0,012	(1)
K_{Na}^o	34,7 mM	(1)
K_K^o	0,094 mM	(1)
K_{Na}^i	0,856 mM	(1)
K_K^i	4,83 mM	(1)
K_{ATP}^i	0,155 mM	(1)
K_{ADP}^i	5 mM	(1)
Q_{KCC}	$4,21 \times 10^{-3} \mu\text{mol/s.cm}^2$	(2)
Q_{KCC}^{glia}	$5,35 \times 10^{-4} \mu\text{mol/s.cm}^2$	(2)
$K_{K,KCC}^i$	7,34 mM	(2)
$K_{Cl,KCC}^i$	92,02 mM	(2)
$K_{K,KCC}^o$	7,34 mM	(2)
$K_{Cl,KCC}^o$	92,02 mM	(2)
$K_{K,KCC}^{glia}$	2,30 mM	(2)
$K_{Cl,KCC}^{glia}$	0,10 mM	(2)
$K_{K,KCC}^{o,glia}$	500 mM	(2)
$K_{Cl,KCC}^{o,glia}$	200 mM	(2)
Q_{NKCC}	$4,72 \times 10^{-3} \mu\text{mol/s.cm}^2$	(2)
Q_{NKCC}^{glia}	$2,80 \times 10^{-2} \mu\text{mol/s.cm}^2$	(2)
$K_{Na,NKCC}$	70 mM	(2)
$K_{K,NKCC}$	2,3 mM	(2)
$K_{Cl,NKCC}$	25 mM	(2)
$Q_{Na,H}$	$1,09 \times 10^{-4} \mu\text{mol/s.cm}^2$	(3)
$Q_{Na,H}^{glia}$	$7,94 \times 10^{-4} \mu\text{mol/s.cm}^2$	(3)
$K_{Na,troc}$	10 mM	(3)
$K_{Na,troc}^{glia}$	13 mM	(3)
$K_{K,H}$	800 mM	(3)
$K_{K,H}^{glia}$	300 mM	(3)
$Q_{HCO_3,Cl}$	$9,81 \times 10^{-5} \mu\text{mol/s.cm}^2$	(3)
$Q_{HCO_3,Cl}^{glia}$	$3,38 \times 10^{-4} \mu\text{mol/s.cm}^2$	(3)
$K_{Cl,troc}$	6 mM	(3)
$K_{Cl,troc}^{glia}$	0,1 mM	(3)

- (1) Parâmetros relativos à bomba- Na^+/K^+ , ajustados segundo os procedimentos descritos em (Almeida et al., 2008; Rodrigues, 2003).
- (2) Parâmetros ajustados para reproduzir os dados experimentais em: (Payne, 1997) (cotrasporte KCC), (Tas et al., 1987) (cotransporte NKCC).
- (3) Os parâmetros dos trocadores Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, em neurônios e glias, foram ajustados para reprodução das concentrações de equilíbrio no repouso. As constantes de equilíbrio do trocador Na^+/H^+ , relacionadas ao transporte de K^+ , $K_{K,H}$ e $K_{K,H}^{glia}$ foram ajustadas para controlar o acúmulo desse íon no ME (Almeida et al., 2008; Rodrigues, 2003).

che, 1333 MHz FSB), com memória de 32GB (8x4 GB), sob a plataforma GNU/LINUX. Para simular 1000 s de atividades, em uma rede contendo 125 compartimentos, com um único plano representando a perfusão, foram gastos cerca de três horas (não utilizamos processamento em paralelo).

A figura 4.6 fornece um esquema da ordem de realização dos cálculos durante a simula-

ção. Seis são os estágios, ou etapas, principais. Na etapa (1) são carregados os parâmetros de inicialização descritos na tabela 3.5, correspondentes ao estado de repouso do tecido. Nesta etapa a $[K^+]_o$ vale 4 mM. Além disso, são também carregadas as constantes do modelo (tabelas 3.1- 3.4). Em seguida, inicia-se a estrutura de repetição para a evolução temporal do sistema. A cada ciclo de 10^{-4} s, as variáveis dinâmicas do modelo são atualizadas. Em um tempo igual a 0,1 ms, modifica-se a $[K^+]_o$ para o valor 8 mM, para indução das atividades epileptiformes. Na etapa (2) são calculados os fluxos iônicos devidos aos mecanismos de transporte nas gliais, para atualização das CIs gliais, bem como das CIs extracelulares. No estágio seguinte (etapa 3), determinam-se os fluxos iônicos pelos canais, bomba, cotransportadores e trocadores neuronais. Nesta etapa são calculados os potenciais transmembrânicos, as CIs neuronais e extracelulares. A próxima etapa (etapa 4) traz os cálculos dos volumes celulares. Na sequência, etapa 5, resolvem-se as correntes pelas GJs e as CIs intracelulares modificadas pela ação desse mecanismo. Posteriormente, na etapa 6, calculam-se as concentrações iônicas extracelulares modificadas pela eletrodifusão extracelular. Finalmente, as concentrações extracelulares são corrigidas para satisfazer às condições de contorno impostas pela simulação da perfusão.

Tabela 3.4: Demais parâmetros do modelo AENS

Parâmetro			Referência
$\Phi_{Na,vaz}$	Fluxo de vazamento de Na^+	$-3,95 \times 10^{-8}$ mmol/s.cm ²	(1)
$\Phi_{K,vaz}$	Fluxo de vazamento de K^+	$-3,0 \times 10^{-8}$ mmol/s.cm ²	(1)
$\Phi_{Cl,vaz}$	Fluxo de vazamento de Cl^-	$-1,39 \times 10^{-7}$ mmol/s.cm ²	(1)
$\Phi_{Na,vaz}^{glia}$	Fluxo de vazamento de Na^+ glial	$-2,43 \times 10^{-7}$ mmol/s.cm ²	(1)
$\Phi_{K,vaz}^{glia}$	Fluxo de vazamento de K^+ glial	$-2,43 \times 10^{-7}$ mmol/s.cm ²	(1)
$\Phi_{Cl,vaz}^{glia}$	Fluxo de vazamento de Cl^- glial	$-2,23 \times 10^{-7}$ mmol/s.cm ²	(1)
τ	Medida da resistividade do tecido	$6,25 \times 10^{-3}$ mV.s/mM	(2)
ε	Condutância do ME	$7,3 \times 10^{-6}$ mA/mV.m ²	(3)
ν	Taxa de variação do volume neuronal	$4,5 \times 10^{-17}$ cm ² /s	(4)
n_s^i	Fração de solutos impermeantes no MI	$9,01 \times 10^{-10}$ mmol	(5)
n_s^o	Fração de solutos impermeantes no ME	$3,15 \times 10^{-11}$ mmol	(4)

- (1) Parâmetros ajustados para manter a estabilidade do repouso, antes da perfusão com alta $[K^+]_o$.
- (2) Parâmetro ajustado para reproduzir as amplitudes dos *population spikes* observadas em experimentos realizados no LANEK.
- (3) Ajustado para reproduzir os dados de (Snow e Dudek, 1986), segundo os quais há uma indução em torno de 50% das amplitudes dos *population spikes*.
- (4) Ajustado para reproduzir os potenciais extracelulares observados durante experimentos realizados no LANEK.
- (5) Parâmetro ajustado para manter o volume celular constante durante o repouso.

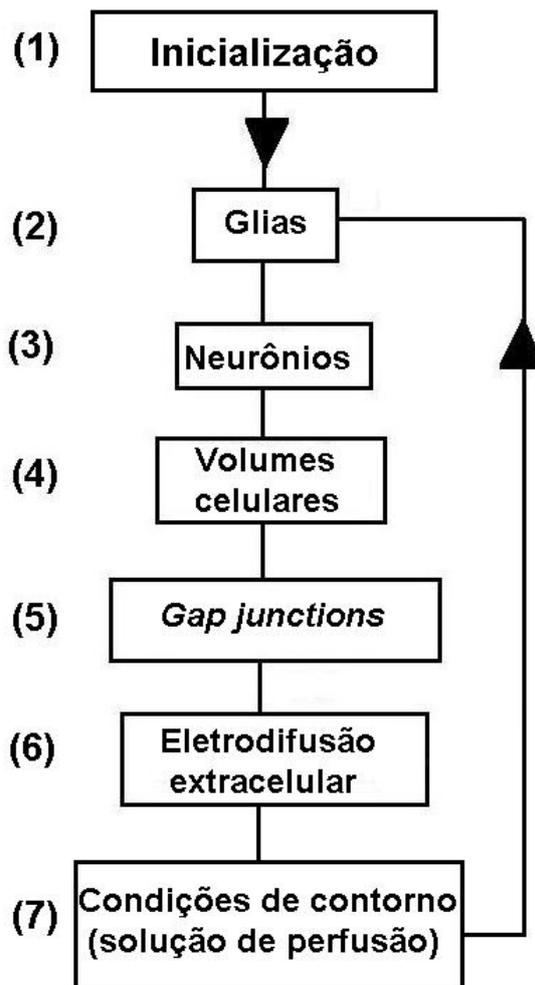


Figura 3.8: Esquema representando a ordem de execução dos cálculos na simulação do modelo AENS.

Tabela 3.5: Parâmetros de inicialização

Parâmetro de inicialização			Referência
$[\text{Na}^+]_o$	Concentração extracelular de Na^+	131 mM	(1)
$[\text{K}^+]_o$	Concentração extracelular de K^+	4 mM	(1)
$[\text{Cl}^-]_o$	Concentração extracelular de Cl^-	130 mM	(1)
$[\text{Na}^+]_i$	Concentração intracelular de Na^+	10 mM	(1)
$[\text{K}^+]_i$	Concentração intracelular de K^+	130 mM	(1)
$[\text{Cl}^-]_i$	Concentração intracelular de Cl^-	9 mM	(1)
$[\text{Na}^+]_{i,glia}$	Concentração glial de Na^+	10 mM	(1)
$[\text{K}^+]_{i,glia}$	Concentração glial de K^+	130 mM	(1)
$[\text{Cl}^-]_{i,glia}$	Concentração glial de Cl^-	9 mM	(1)
V_m	Potencial de repouso neuronal	-69 mV	(1)
$V_{m,glia}$	Potencial de repouso glial	-79 mV	(1)
$V_{in,neur}$	Volume neuronal	$4,19 \times 10^{-12} \text{ dm}^3$	(1)
$V_{in,glia}$	Volume glial	$4,19 \times 10^{-13} \text{ dm}^3$	(1)
V_{extra}	Volume do ME	$3,15 \times 10^{-12} \text{ dm}^3$	(1)
m	Ativação (Na^+ transiente)	0,03	(2)
h	Inativação (Na^+ transiente)	0,1	(2)
w	Ativação (Na^+ persistente)	$3,0 \times 10^{-4}$	(2)
n	Ativação (K^+ retificador tardio)	0,78	(2)
a	Ativação (K^+ do tipo A)	0,1	(2)
b	Inativação (K^+ do tipo A)	0,8	(2)

(1) Parâmetros ajustados de acordo com os dados experimentais em (Almeida et al., 2004; Kager et al., 2002; Xiong e Stringer, 2001).

(2) Valores correspondentes às condições de repouso.

Capítulo 4

Sincronização

Neste capítulo fazemos uma breve introdução à teoria da sincronização de osciladores acoplados, com referência às técnicas para extração de fases e medida de correlações temporais entre fases.

4.1 Sincronização

Sincronização é o ajuste dos ritmos de osciladores devido à sua interação (Pikovsky et al., 2001). Este fenômeno, freqüentemente observado na natureza, envolve objetos ou sistemas acoplados que exibem comportamento periódico auto-sustentado. O acoplamento, cuja intensidade deve preservar a independência dos osciladores, faz surgir relações entre suas freqüências e fases. Se o acoplamento for bidirecional, falamos de sincronização mútua. Se unidirecional, esperamos a sincronização por força externa, onde o oscilador agente ajusta o ritmo do oscilador resposta. Neste último caso, o fenômeno se distingue da ressonância, na qual o oscilador resposta não é auto-sustentado e, portanto, tem o ritmo induzido pelo agente.

Usualmente, distinguem-se quatro tipos de sincronização a depender de como se estabelece o ajuste de ritmos: sincronização completa, sincronização com atraso, sincronização generalizada e sincronização de fase (Pikovsky et al., 2001).

Na sincronização completa, a interação entre dois osciladores idênticos (mesma dinâmica e igual conjunto de parâmetros) faz com que seus estados coincidam. Tal coincidência é preservada no tempo:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} |\tilde{x}(t) - \tilde{y}(t)| = 0 \quad (4.1)$$

\tilde{x} e \tilde{y} são os vetores de estado dos osciladores x e y , respectivamente.

Uma particularidade do tipo anterior é a sincronização com atraso, na qual existe um deslocamento temporal entre os estados dos osciladores:

$$\tilde{x}(t + \tau) = \tilde{y}(t) \quad (4.2)$$

No limite em que $\tau \rightarrow 0$ o regime transita para sincronização completa.

Um caso que abrange os tipos anteriores é o da sincronização generalizada. Nela há o surgimento de uma relação funcional entre os estados dos dois sistemas, não necessariamente idênticos:

$$\tilde{x}(t + \tau) = F[\tilde{y}(t)] \quad (4.3)$$

Este tipo de sincronização é comumente observado quando o acoplamento é unidirecional (interação do tipo mestre-escravo) (Pikovsky et al., 1997).

Na sincronização de fase há o estabelecimento de uma relação temporal entre as fases dos osciladores, expressa pela condição de travamento (ou bloqueio) de fases *-phase locking*. Nesta condição, a diferença entre múltiplos inteiros das fases é limitada:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} |m\varphi_x(t) - n\varphi_y(t)| < const \quad (4.4)$$

m e n são inteiros e as variáveis φ denotam fases. Neste caso a sincronização é do tipo $m : n$ (para cada m ciclos do oscilador x observamos n ciclos do oscilador y). Outra condição é a de arrastamento de frequências (*frequency entrainment*):

$$m\langle\omega_x\rangle = n\langle\omega_y\rangle \quad (4.5)$$

É importante salientar que tais condições são efetivas quando a diferença entre frequências é pequena. Também as amplitudes dos osciladores podem permanecer completamente independentes. Caso contrário, uma transição para sincronização com atraso se estabelece (Pikovsky et al., 2001; Rosenblum et al., 2001).

A sincronização de fase foi primeiramente observada por Christian Huygens ao descrever o comportamento síncrono de relógios de pêndulo em interação fraca. No entanto, o estudo sistemático deste fenômeno começou somente na década de 20, com os experimentos de Appleton e Van der Pol em geradores elétricos. Há mais de uma década, estendeu-se o conceito a osciladores não-lineares e caóticos (Rosenblum e Pikovsky, 1996). Atualmente tem sido vastamente aplicado à análise de séries temporais biológicas, particularmente de sinais neurais (Mormann et al., 2000; Rosenblum et al., 2001; Tass et al., 1998).

Para caracterizar sincronização de fase duas abordagens são possíveis. Na primeira, reduz-se a complexidade de um oscilador auto-sustentado a uma dinâmica de fases, permitindo prever os estados de sincronização do conjunto acoplado. Esse caminho se faz possível quando se conhecem as equações que descrevem a evolução dos osciladores. Além disso, aqui o conceito de reposta de fase a uma perturbação externa é fundamental (Izhi-

kevich, 2007).

A segunda abordagem tem sido bastante aplicada a séries temporais cuja dinâmica é desconhecida, particularmente a dados experimentais (Quiroga et al., 2002; Quyen et al., 2001). Aplica-se ainda, quando o grau de complexidade das equações de evolução torna proibitivo o uso da redução a uma dinâmica de fases. Nesta abordagem as fases são extraídas usando técnicas de análise de sinais. Depois são aplicados índices para quantificar o nível de sincronização.

4.1.1 Sincronização de *bursts*

O *bursting* é largamente observado no sistema nervoso central (Izhikevich, 2007; Purves et al., 2004). Neurônios disparam potenciais de ação isolados ou em *bursts* a depender de suas características endógenas ou da natureza de um estímulo. Todo *bursting* é formado por uma seqüência de potenciais de ação seguidos por um período quiescente ou de silêncio. É um padrão de oscilação que exhibe duas escalas de tempo originadas por correntes rápidas moduladas por fluxos iônicos lentos (Izhikevich, 2007).

Há dois regimes de sincronização associados a esse padrão oscilatório (figura 4.1): sincronização entre *spikes* e entre as modulações lentas do *burst* (sincronização entre *bursts*). Ainda existe um terceiro regime de sincronização simultânea entre potenciais de ação e entre *bursts*.

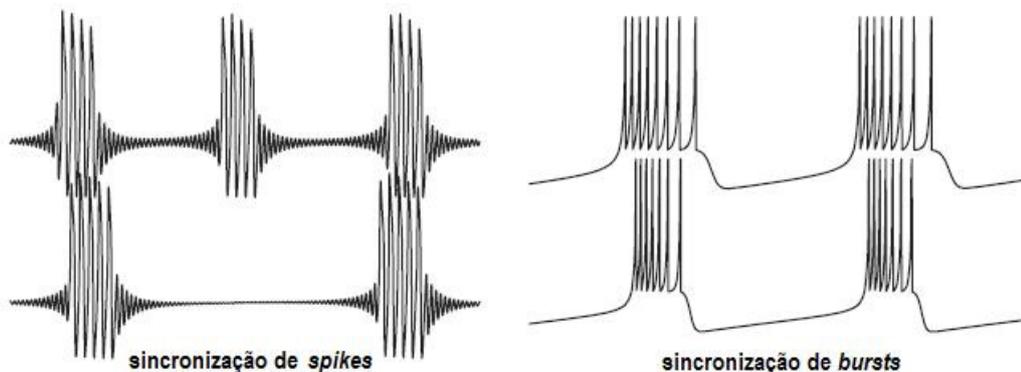


Figura 4.1: Regimes de sincronização associados ao *bursting* (modificado de (Izhikevich, 2007)).

As técnicas de redução a uma dinâmica de fases podem ser aplicadas ao *bursting* quando os acoplamentos ocorrem pelas variáveis relativas a uma única escala de tempo. Quando isto acontece, podemos eliminar as variáveis de uma dada escala, aplicando os métodos anteriores à dinâmica restante (Izhikevich, 2007).

No caso do modelo de atividades epileptiformes, os acoplamentos combinam variáveis

rápidas e lentas por relações não-lineares (capítulo 3) e não é possível desacoplar as escalas de tempo para aplicar as técnicas de redução.

4.2 Extração de fases

A fase φ_0 de um oscilador auto-sustentado, cujo movimento é uniforme, tem a seguinte definição: é um ponto sobre a trajetória fechada no espaço de fases, a qual possui um único centro de rotação. A equação a seguir governa sua evolução temporal:

$$\frac{d\varphi_0}{dt} = \omega_0 \quad (4.6)$$

$\omega_0 = 2\pi/T_0$ e T_0 é o período da oscilação. Ela corresponde à variável cujas perturbações não decaem e também não crescem (Izhikevich, 2007; Pikovsky et al., 2001; Rosenblum et al., 2001). Se o movimento oscilatório é não-uniforme, podemos usar os cruzamentos com uma seção de Poincaré para definir a fase. Entre dois cruzamentos com o mesmo plano ela cresce uniformemente no intervalo $[0, 2\pi]$. No entanto, se o movimento for complexo, ainda podemos definir fase, sob algumas restrições.

A primeira solução é representar a evolução temporal por uma função no plano complexo, por meio da transformada de Hilbert, que veremos a seguir. Além disso, esta solução é satisfeita, sem ambigüidades, se a série temporal possui componentes espectrais principais numa faixa de frequências estreita. Caso contrário, se aplicarmos a transformada de Hilbert à série temporal, no plano complexo veremos vários centros de rotação sobrepostos (figura 4.2). Logo, não poderemos definir fases sem ambigüidades (Chavez et al., 2006; Vakman e Vainshtein, 1977). Para eliminar esse problema, utilizamos procedimentos de filtragem. No caso de um sinal multiespectral e não estacionário a solução é aplicar um filtro de resposta unitária e que não altere as fases para selecionar a faixa de interesse.

4.2.1 Eventos de referência

Algumas séries temporais podem ser caracterizadas pela presença de eventos de referência. Neste caso podemos determinar as fases associando os tempos t_n ($n = 1, 2, \dots$) a cada evento. O intervalo de tempo entre t_n e t_{n+1} corresponde a um acréscimo de um ciclo à fase. Para tempos arbitrários expressamos a fase por meio de uma função linear do tempo. Cada ciclo completo produz um acréscimo de 2π (Rosenblum et al., 2001):

$$\varphi(t) = 2\pi n + 2\pi \frac{t - t_n}{t_{n+1} - t_n}, t_n \leq t < t_{n+1} \quad (4.7)$$

Quando a série temporal contém vários componentes de frequência, é preciso selecionar os eventos de referência para cada faixa.

4.2.2 Transformada de Hilbert

A extração de fases pela transformada de Hilbert baseia-se na técnica do sinal analítico, largamente utilizada em processamento de sinais (Rosenblum e Kurths, 1998). Considere um sinal contínuo real, $s(t)$. O sinal analítico é construído por meio da definição:

$$\nu(t) = s(t) + iu(t) = A_s^H(t)e^{i\phi_s^H(t)} \quad (4.8)$$

$u(t)$ é a transformada de Hilbert do sinal:

$$u(t) \equiv H(t) = \frac{1}{\pi} \text{p.v.} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{s(\tau)}{t - \tau} d\tau \quad (4.9)$$

na qual p.v. significa valor principal de Cauchy. Note que a equação (4.9) é a convolução do sinal original com a função $1/\pi t$. A transformada de Hilbert produz um deslocamento de fase de $-\pi/2$ para cada componente espectral de $u(t)$. Na prática, o procedimento consiste na construção de um sinal complexo, o qual permite uma definição unívoca de amplitude e fase:

$$\phi_s^H(t) = \arctan \frac{H\{s(t)\}}{s(t)} \quad (4.10)$$

Como exemplo, considere a função $f(t) = \cos(\omega t)$, ω constante. A transformada de Hilbert desta função é: $H\{f(t)\} = \cos(\omega t - \pi/2) = \sin(\omega t)$. Na figura 4.3 ilustra-se esta função e sua transformada, bem como a trajetória no plano complexo, fazendo-se o gráfico de $f(t)$ contra $H\{f(t)\}$.

Aplicando o teorema da convolução da transformada de Fourier à transformada de Hilbert, obtemos uma forma, via FFT, cujo cálculo é acelerado (Oppenheim et al., 1999):

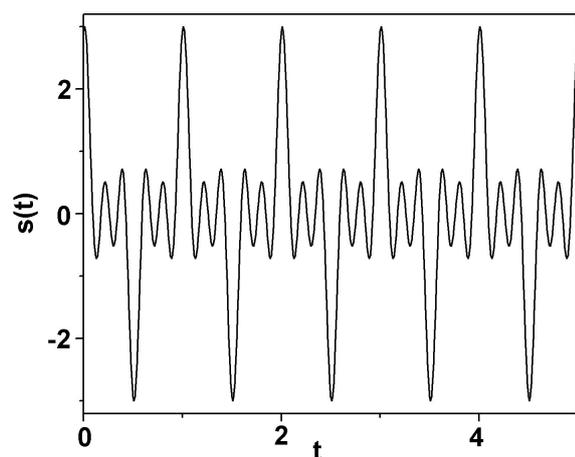
$$H\{s(t)\} = F^{-1}\left\{F\left\{\frac{1}{\pi t}\right\}F\{s(t)\}\right\} = F^{-1}\{-i\text{sgn}(\omega)F\{s(t)\}\} \quad (4.11)$$

4.2.3 Transformada de contínua de ondaleta

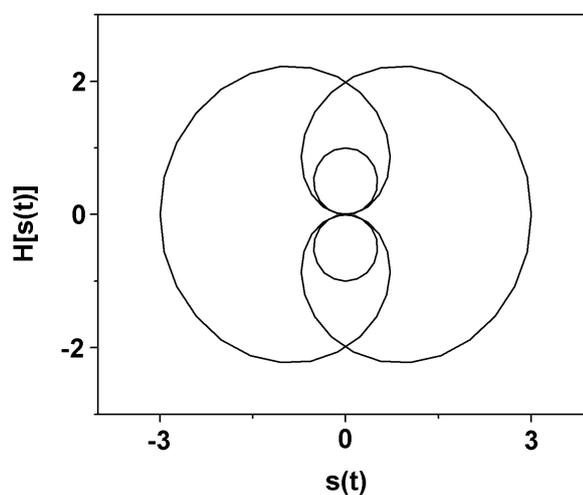
A técnica da transformada contínua de ondaleta requer o cálculo dos coeficientes da seguinte transformação sobre uma série temporal $s(t)$ (Addison et al., 2002; Torrence e Compo, 1998):

$$T(a, b) = \int_{-\infty}^{\infty} s(t) \frac{1}{\sqrt{a}} \psi_a^*(t - b) dt \quad (4.12)$$

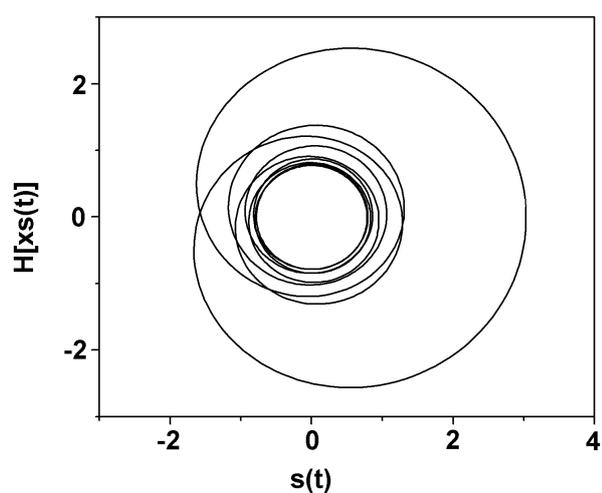
Os fatores a e b denotam escala e translação temporal, respectivamente. As funções ψ_a são cópias de uma função-protótipo: a ondaleta-mãe, $\Psi(t)$. O subscrito ‘ a ’ significa que a função é uma versão dilatada ou comprimida de $\Psi(t)$ a depender da escala ($a < 1$ implica dilatação e $a > 1$ compressão - figura 4.4). Aplicar a equação (4.12) à função $s(t)$,



(a)

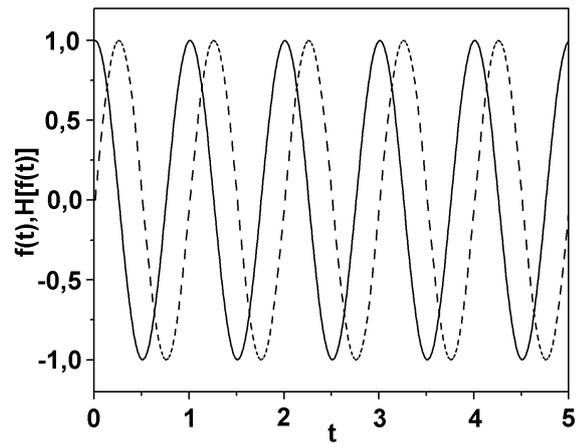


(b)

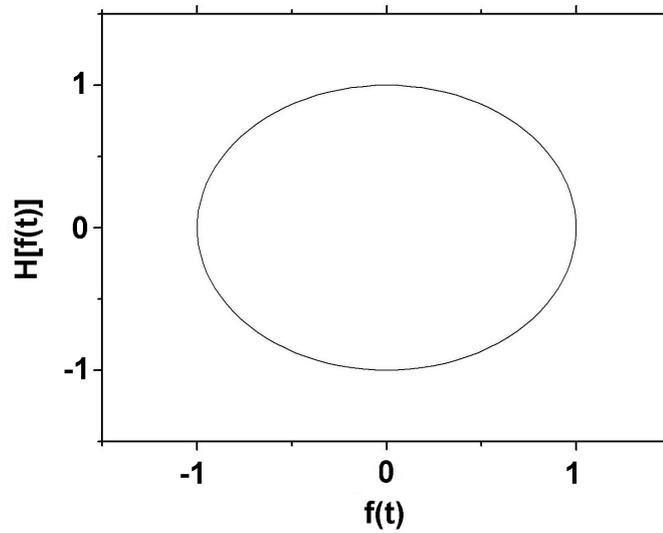


(c)

Figura 4.2: Função $s(t) = \cos(\omega t) + \cos(3\omega t) + \cos(5\omega t)$ (a) e trajetórias no plano complexo obtidas com o cálculo da transformada de Hilbert (b,c). Observe os múltiplos centros de rotação em (b), o que torna a definição de fase não unívoca. Em (c) filtramos o sinal, isolando uma das frequências, restando um único centro de rotação. Neste caso o conceito de fase não é ambíguo.



(a)



(b)

Figura 4.3: (a) Função $\cos(\omega t)$ (linha cheia) e sua transformada de Hilbert (linha tracejada). (b) A trajetória no plano complexo.

equivale a realizar um número de varreduras sobre todos os pontos compondo a série. O total de varreduras é igual à quantidade de escalas (ou frequências) que se deseja analisar.

Note que escalas são equivalentes a frequências. Um procedimento para determinar essa relação é calcular o valor de ‘a’ que maximiza a função (Torrence e Compo, 1998):

$$|T(a, b)| = \left| \int_{-\infty}^{\infty} e^{i\omega_k t} \frac{1}{\sqrt{a}} \psi_a^*(t - b) dt \right|^2 \quad (4.13)$$

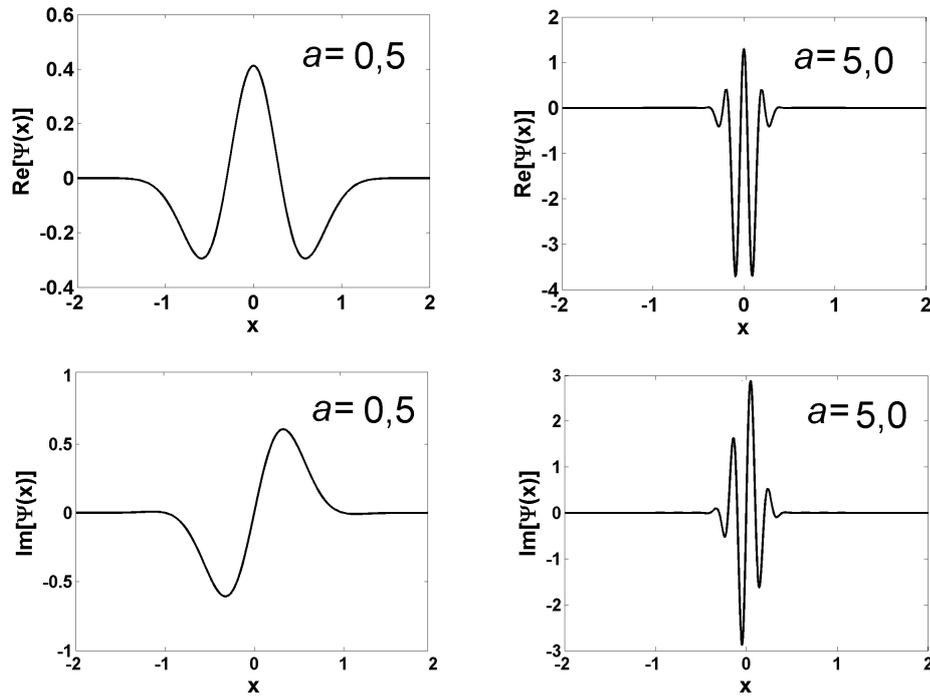


Figura 4.4: Dilatação e compressão das partes real e imaginária de uma ondaleta-mãe, a função de Morlet (Ψ). (esquerda: $a = 0,5$; direita: $a = 5,0$).

Para o cálculo de fase a ondaleta-mãe é uma função complexa que deve obedecer a algumas restrições, as condições de admissibilidade (Addison et al., 2002). Sendo assim podemos escrever:

$$T(a, b) = A_s^T e^{i\phi_s^T t} \quad (4.14)$$

$$\phi_s^T(t) = \arctan \frac{\text{Im}\{T(a, b)\}}{\text{Re}\{T(a, b)\}} \quad (4.15)$$

Uma ondaleta bastante utilizada é uma versão da função completa de Morlet (Addison et al., 2002):

$$\Psi(t) = \frac{1}{\pi^{1/4}}(e^{if_0t} - e^{-f_0^2/2\sigma^2})e^{-t^2/2\sigma^2} \quad (4.16)$$

onde f_0 é a frequência central (em Hz) e σ fornece a largura de banda ou resolução temporal da transformada. O fator de correção $e^{-t^2/2\sigma^2}$ é para garantir a condição de admissibilidade $F\{\psi\}(\omega=0) = 0$. Usando o conceito de número de oscilações significativas pode-se substituir a representação em escala (uma grandeza adimensional) pela representação em frequência, evitando o uso da equação (4.12). No caso da função completa de Morlet, a resolução da eq.(4.13) implica resolver uma equação transcendente.

Por convenção, uma oscilação é considerada significativa se sua amplitude vale mais do que 1% da amplitude em $t = 0$. Seja n_c o número de oscilações significativas. Então é possível demonstrar a relação (Kraskov, 2004):

$$\sigma = \frac{n_c}{6f_0} \quad (4.17)$$

Substituindo-a na equação (4.15) obtemos:

$$\psi(f_0t) = \frac{1}{\pi^{1/4}}(e^{if_0t} - e^{-\alpha^2/2})e^{-(f_0t)^2/2\alpha^2} \quad (4.18)$$

na qual $\alpha=n_c/6$. Esta nova função é uma versão escalada da ondaleta-mãe:

$$\Psi(t) = \frac{1}{\pi^{1/4}}(e^{it} - e^{-\alpha^2/2})e^{-t^2/2\alpha^2} \quad (4.19)$$

Os coeficientes da transformada de ondaleta são obtidos usando um algoritmo de transformada rápida de Fourier. Basta observar que a equação (4.12) pode ser reescrita como uma integral de convolução. Assim, pelo teorema da convolução:

$$T(f_0, b) = F^{-1}\{F\{\sqrt{f_0}\psi(f_0t)\}F\{s(t)\}\} \quad (4.20)$$

Existe uma relação estreita entre as transformadas de Hilbert e de ondaleta: de fato, a última equivale à primeira após se aplicar um filtro passa-faixa ao sinal (Kraskov, 2004; Quiroga et al., 2002).

Para extração de fases de um padrão oscilatório como o *bursting* é preciso cautela quanto à escolha da ondaleta-mãe. Por exemplo, para ajustar o parâmetro α , pode-se usar $n_c = 1$ para examinar todo o espectro da série temporal, significando que as funções-protótipo possuem apenas uma oscilação significativa, cuja forma é mais adequada à análise de potenciais de ação. O aumento do número de oscilações significativas ainda não produz uma função adequada à análise das oscilações em baixa frequência do *bursting* (figura 4.5). Este pé o ponto fraco da escolha da função completa de Morlet como ondaleta-mãe: a pouca precisão para análise de *bursts*. Na figura 4.5 a forma dessas oscilações em baixa frequência se ajustaria melhor a funções do tipo onda-quadrada. Portanto, os resultados podem se tornar mais precisos com a escolha de outra ondaleta-mãe para análise em baixa

frequência.

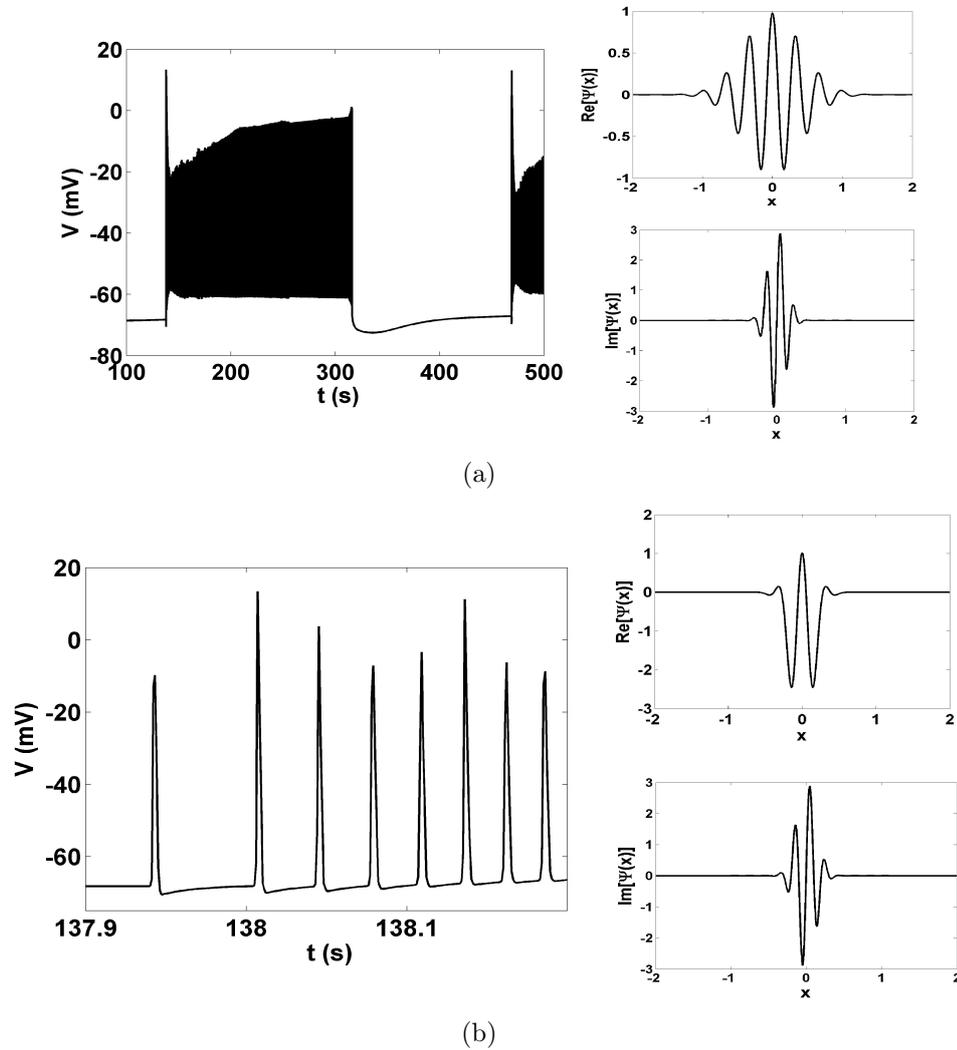


Figura 4.5: Oscilações do modelo AENS (esquerda) e formas da função completa de Morlet (direita). (a) Oscilações lentas do burst e função de Morlet com $n_c = 6$. (b) Potenciais de ação e função de Morlet com $n_c = 1$.

4.3 Quantificando sincronização

As grandezas a seguir quantificam o nível de sincronização em um sistema.

4.3.1 Medidas clássicas de correlação temporal

Uma medida clássica de sincronização é a função correlação cruzada normalizada no domínio do tempo (Quiroga et al., 2002; Quyen et al., 2001). Ela infere o grau de

correlação entre duas séries temporais em função da defasagem temporal τ . No caso discreto:

$$c_{xy}(\tau) = \begin{cases} \frac{1}{N-\tau} \sum_{n=1}^{N-\tau} \left(\frac{x_{n+\tau} - \bar{x}}{\sigma_x} \right) \left(\frac{y_n - \bar{y}}{\sigma_y} \right), \tau \geq 0 \\ c_{xy}(-\tau), \tau < 0 \end{cases} \quad (4.21)$$

Onde \bar{x} e \bar{y} denotam médias e σ_x, σ_y são as variâncias. A normalização assegura que $c_{x,y}(\tau) \in [-1,1]$, ou seja este índice varia entre -1 (anti-sincronização completa) e 1 (sincronização completa). Valores próximos de zero significam independência entre séries temporais. A correlação cruzada normalizada é um índice simétrico: $c_{x,y}(\tau) = c_{y,x}(\tau)$. Além disso, ele não permite separar os efeitos de amplitudes e fases nas inter-relações entre sinais (Quyen et al., 2001). Por isso, esse tipo de análise complementa uma investigação de sincronização de fase.

Outras duas medidas tradicionalmente usadas são a correlação cruzada quando a defasagem é nula, $c_{x,y}(0)$ e o valor máximo da correlação cruzada (Quiroga et al., 2002):

$$c_{max} = \max_{\tau} \{|c_{xy}(\tau)|\} \quad (4.22)$$

Usa-se a primeira medida para investigar sincronização completa ou sincronização de fase 1:1, pois neste caso procuramos as condições que induzem a uma defasagem temporal nula. A segunda medida permite investigar condições mais gerais de sincronização.

4.3.2 Coerência de fase média

A coerência de fase média (CFM) fornece uma medida do espalhamento das diferenças de fase no círculo unitário no plano complexo (Mormann et al., 2000):

$$\gamma_{n,m} = |\langle e^{\varphi_{x,y}^{(n,m)}(t)} \rangle|, \varphi_{x,y}^{(n,m)}(t) = n\varphi_x(t) - m\varphi_y(t) \quad (4.23)$$

$\langle \rangle_t$ indica média temporal e $\varphi_{x,y}^{(n,m)}(t)$ é a fase relativa quando há sincronização do tipo $n:m$ (investigamos apenas o caso $n=m=1$; neste caso $\gamma_{n,m} = \gamma$). O índice é restrito ao intervalo $[0,1]$. Se a relação temporal entre as fases de cada oscilador é estável, então a CFM tem valor próximo a um. Caso contrário, se as fases se mantêm independentes, a CFM tende a ser nula. Na figura 4.6 ilustramos o comportamento das fases na evolução para um regime de sincronização. Nesta ilustração usamos o recurso da observação estroboscópica (Pikovsky et al., 2001). Cada ponto no círculo unitário representa um valor de fase observado em instantes de tempo distintos enquanto o valor da fase do segundo oscilador se mantém fixo. A CFM é representada pelo vetor que aponta para a fase relativa e cujo módulo cresce na medida em que o par evolui para o regime de sincronização. Quando esse regime é alcançado os pontos se tornam concentrados. Observando a distribuição

das fases relativas, quando não há sincronização do par de osciladores a distribuição é uniforme. Quando há sincronização a distribuição se torna concentrada (figura 4.7).

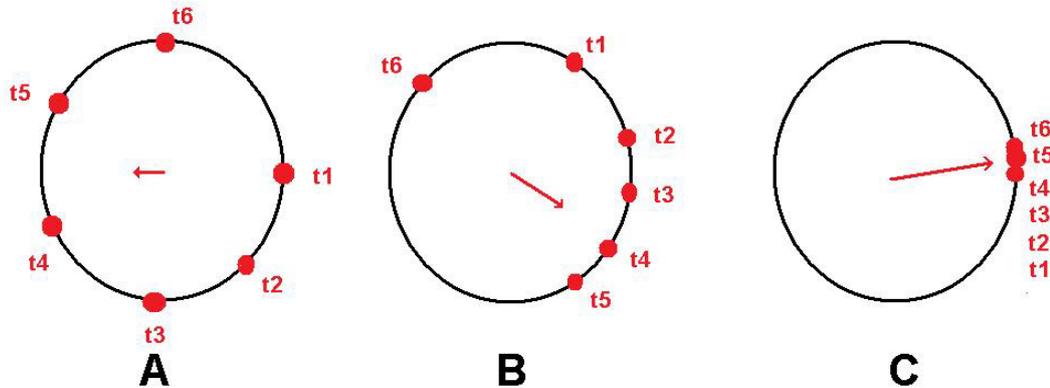


Figura 4.6: Representação no círculo unitário das fases do primeiro oscilador (pontos em vermelho) em vários instantes de tempo, mantendo-se a fase do segundo oscilador fixa. Representa-se a CFM vetor no centro do círculo. Quando o par entra em um regime de sincronização, as fases do primeiro oscilador tendem a se concentrar. Isto significa que se estabeleceu uma relação temporal estável entre as fases de cada oscilador (adaptado de (Pikovsky et al., 2001; Rosenblum et al., 2001)).

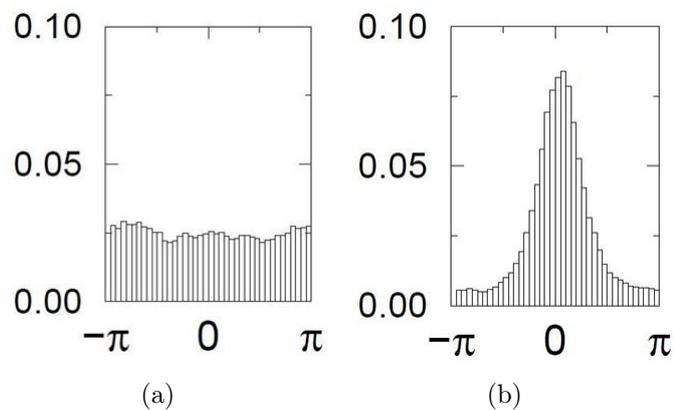


Figura 4.7: Distribuição da fase relativa de um par de osciladores em um regime não sincronizado (a) e de sincronização (b). Em (a) a distribuição da fase relativa é uniforme. Quando o par entra em um regime de sincronização a distribuição é concentrada.

Comparada às medidas clássicas de correlação temporal, a CFM permite analisar sincronização nas diferentes escalas de tempo presentes no *bursting* separadamente, além de considerar somente variações temporais, ao invés de variações nas amplitudes das oscilações. Isto é particularmente útil para análise de sincronização em osciladores caóticos. Neste caso podem se estabelecer regimes de sincronização quando as amplitudes dos os-

ciladores permanecem completamente independentes (Rosenblum e Pikovsky, 1996).

4.3.3 Outras medidas de sincronização: entropia de Shannon e informação mútua

Os índices baseados na teoria de informação têm sido utilizados para analisar distribuições de probabilidade de sistemas não-lineares. A entropia de Shannon, ou entropia de informação é uma medida do grau de incerteza associada a uma variável aleatória (Cover e Thomas, 2006). Considere a fase de um dado oscilador como uma variável aleatória discreta X que pode assumir um valor dentro do conjunto $\{\varphi_x\}$ com probabilidade p_x . A entropia de Shannon associada à essa variável é:

$$\mathbf{H} = - \sum_x p_x \ln p_x \quad (4.24)$$

cuja unidade de medida é “nats” (as unidades de medida são “dits” para \log_{10} e “bits” para \log_2). Desejamos quantificar o grau de incerteza relacionado à fase relativa, (eq.(4.23), quando $n=m=1$). Para isso usamos o índice normalizado:

$$\eta = 1 - \frac{\mathbf{H}}{\mathbf{H}_{max}} \quad (4.25)$$

Onde \mathbf{H} é a entropia de Shannon da distribuição p_x , \mathbf{H}_{max} é o seu valor máximo e η pertence ao intervalo $[0,1]$. Se o par de osciladores em observação não estiver sincronizado, a distribuição das fases relativas tenderá à uniformidade (figura 4.7). Neste caso, o grau de incerteza a ela associado será máximo ($\mathbf{H}=\mathbf{H}_{max}$) e, portanto, η tenderá a zero. Caso contrário, η tenderá a um. Note que o índice fornece uma medida da prevalência da sincronização de fase 1:1. Para sincronizações do tipo $n:m$ adotamos um segundo índice baseado na informação mútua média. Ela determina o grau de interdependência entre duas distribuições de probabilidade, ou seja, permite quantificar a informação sobre a primeira variável quando se conhece a informação sobre a segunda variável (Cover e Thomas, 2006).

Sejam duas variáveis aleatórias discretas X e Y (ou fases φ_x e φ_y) as quais podem assumir valores dos conjuntos x e y com probabilidades p_x e p_y , respectivamente e probabilidade conjunta $p_{x,y}$. $\mathbf{H}(X)$, $\mathbf{H}(Y)$ e $\mathbf{H}(X,Y)$ são as entropias de Shannon e entropia conjunta. A informação mútua entre as duas variáveis é:

$$I(X, Y) = \sum_{x,y} p_{x,y} \ln \left(\frac{p_{x,y}}{p_x p_y} \right) = \mathbf{H}(X) + \mathbf{H}(Y) - \mathbf{H}(X, Y) \quad (4.26)$$

Para variáveis independentes, $\mathbf{H}(X,Y) = \mathbf{H}(X) + \mathbf{H}(Y)$ e $I(X,Y)=0$. Normalizando a informação mútua pelos valores máximos das entropias de Shannon obtemos o índice MI (do inglês *mutual information*):

$$MI = \frac{2I(X, Y)}{\mathbf{H}_{max}^X \mathbf{H}_{max}^Y} \quad (4.27)$$

onde \mathbf{H}_{max}^X e \mathbf{H}_{max}^Y denotam as entropias máximas relacionadas às variáveis (ou fases) X e Y. A informação mútua pertence ao intervalo $[0, 1]$, sendo que os extremos $MI \rightarrow 0$ e $MI \rightarrow 1$ implicam distribuições independentes das fases (não há sincronização) ou dependentes (sincronização), respectivamente (Quyen et al., 2001).

4.4 Aplicação

Como aplicação da análise de sincronização de fase pelo uso da CFM construímos uma rede quadrada formada por nove neurônios conectados por GJs utilizando condições de contorno periódicas (figura 4.8). Cada neurônio i ($i=1, \dots, N$) exibe *bursting* (figura 4.9), cuja dinâmica é descrita pelo modelo $I_{Na,p} + I_K + I_{K(M)}$ (Izhikevich, 2007):

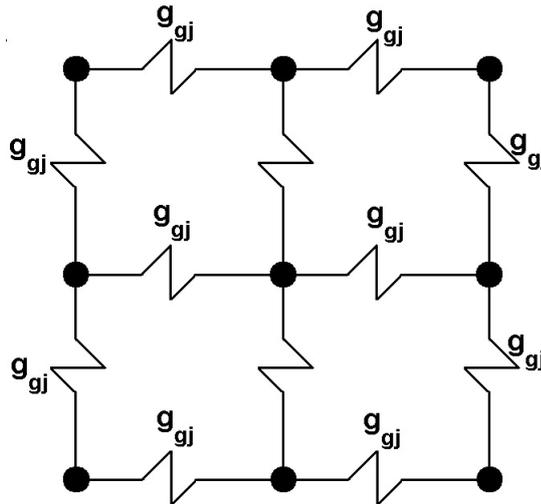


Figura 4.8: Representação da rede de neurônios do modelo $I_{Na,p} + I_K + I_{K(M)}$ conectados por *gap junctions* representadas pelos resistores.

$$C \frac{dV_i}{dt} = I_i - g_L(V_i - E_L) - g_{Na} m_{\infty, i}(V_i - E_{Na}) - g_K n_i(V_i - E_K) - g_M n_{M, i}(V_i - E_K) + I_{GJ} \quad (4.28)$$

$$\frac{dn_i}{dt} = \frac{(n_{\infty, i}(V_i) - n_i)}{\tau_n} \quad (4.29)$$

$$\frac{dn_{M, i}}{dt} = \frac{(n_{\infty, M, i}(V_i) - n_{M, i})}{\tau_M} \quad (4.30)$$

nas quais $C = 1,0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $E_L = 80 \text{ mV}$, $E_{Na} = 60 \text{ mV}$, $E_K = 90 \text{ mV}$. As condutâncias valem $g_L = 8 \text{ mS}/\text{cm}^2$, $g_{Na} = 20 \text{ mS}/\text{cm}^2$, $g_K = 9 \text{ mS}/\text{cm}^2$ e $g_M = 5 \text{ mS}/\text{cm}^2$. As correntes I_i são uniformemente distribuídas no intervalo $[5,0; 6,0] \text{ pA}/\text{cm}^2$. As constantes de tempos são iguais a $\tau_n = 0,152 \text{ ms}$ e $\tau_M = 20 \text{ ms}$. As variáveis de ativação estacionárias são expressas por funções do tipo:

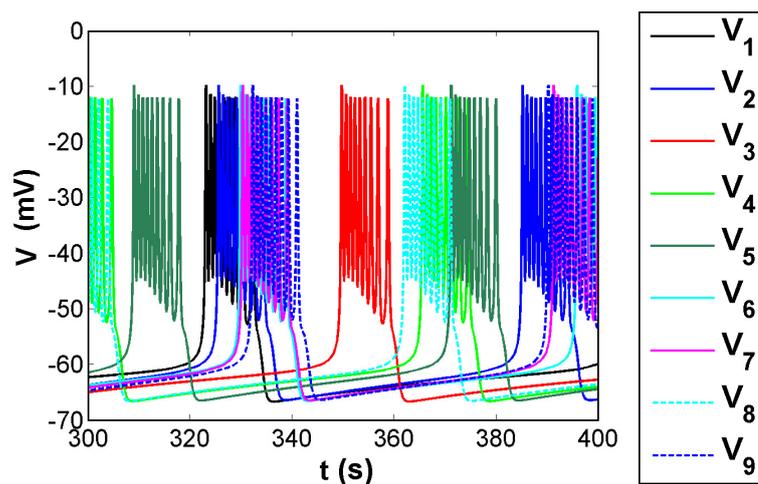
$$\chi(V_i) = \frac{1}{\exp((V_{1/2}^x - V_i)/k_\chi)} \quad (4.31)$$

na qual $\chi = m_{\infty,i}$, $n_{\infty,i}$ e $n_{\infty,M,i}$. $V_{1/2}^n = -25 \text{ mV}$, $V_{1/2}^m = V_{1/2}^{n,M} = -20 \text{ mV}$, $k_{m_{\infty,i}} = 15$ e $k_{n_{\infty,i}} = k_{n_{\infty,M,i}} = 5$. A corrente de acoplamento por GJs é dada por:

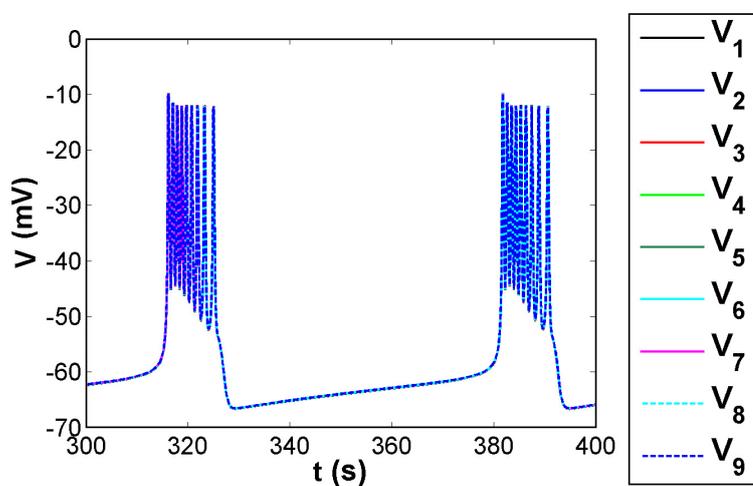
$$I_{GJ} = g_{gj}(V_i - V_j) \quad (4.32)$$

onde g_{gj} é a condutância em mS/cm^2 , a qual representa o parâmetro de acoplamento.

Os potenciais transmembrânicos, para $N=9$, estão representados na figura 4.9, na qual $g_{gj}=0$ e $2,0 \text{ mS}/\text{cm}^2$, este último valor induzindo sincronização completa (figura 4.9). Filtramos os potenciais transmembrânicos usando um filtro passa-baixa com frequência de corte de $0,1\text{Hz}$ para isolar as oscilações lentas e um filtro passa-faixa centrado em $1,0 \text{ Hz}$ (com largura $\pm 0,1 \text{ Hz}$) para separar os potenciais de ação (figura 4.10). Depois calculamos as fases usando a transformada de Hilbert (figura 4.11). Representamos as fases no plano complexo para verificar que as frequências de corte escolhidas originam trajetórias fechadas com centros de rotação bem definidos (figura 4.12). Calculadas as fases, determinamos a CFM entre um par de neurônios típico da rede para alguns valores de g_{gj} , resultando em um aumento da sincronização em todas as faixas de frequências para acoplamentos crescentes (figura 4.13).

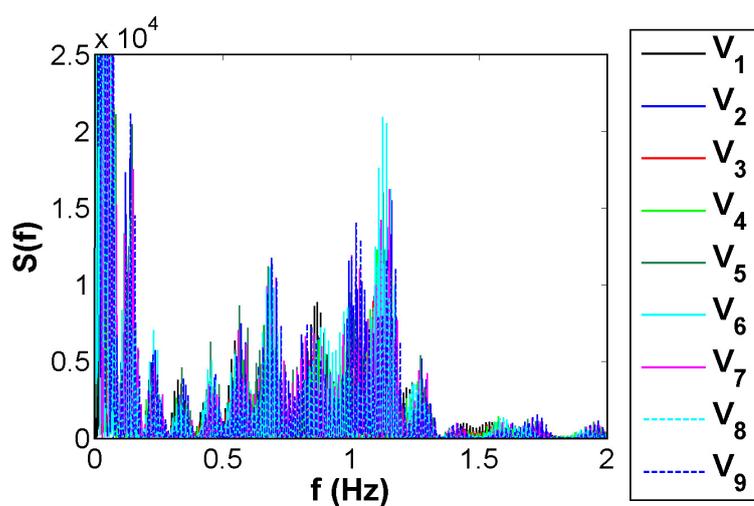


(a)

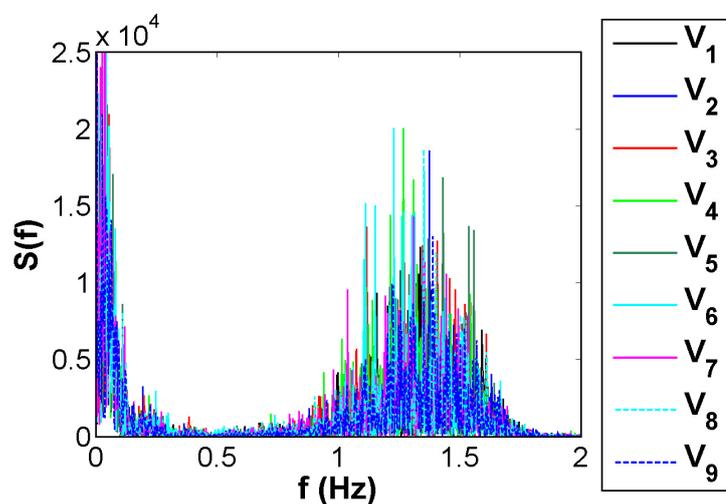


(b)

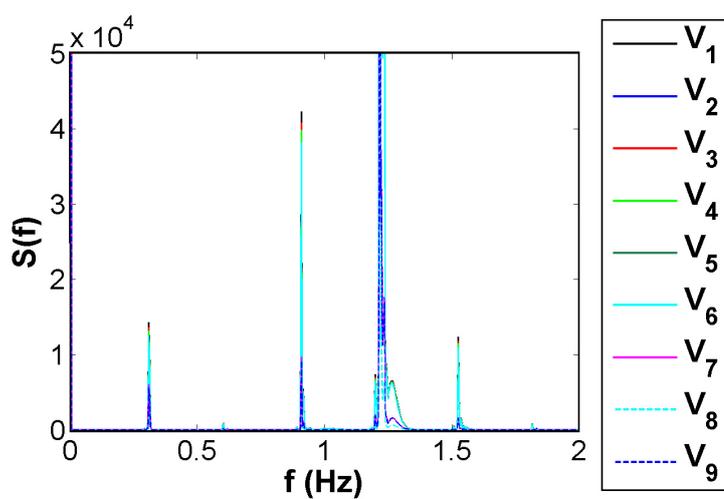
Figura 4.9: Potenciais transmembrânicos dos neurônios da rede quadrada ($N=9$). Em (a) $g_{gj}=0$ e em (b) $g_{gj}=2,0\text{mS}/\text{cm}^2$.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.10: Espectro de potências dos potenciais de membrana do modelo para três valores da condutância das *gap junctions* ($g_{gj}=0,0$ (A); $0,4$ (B) e $1,0$ (C) em mS/cm^2).

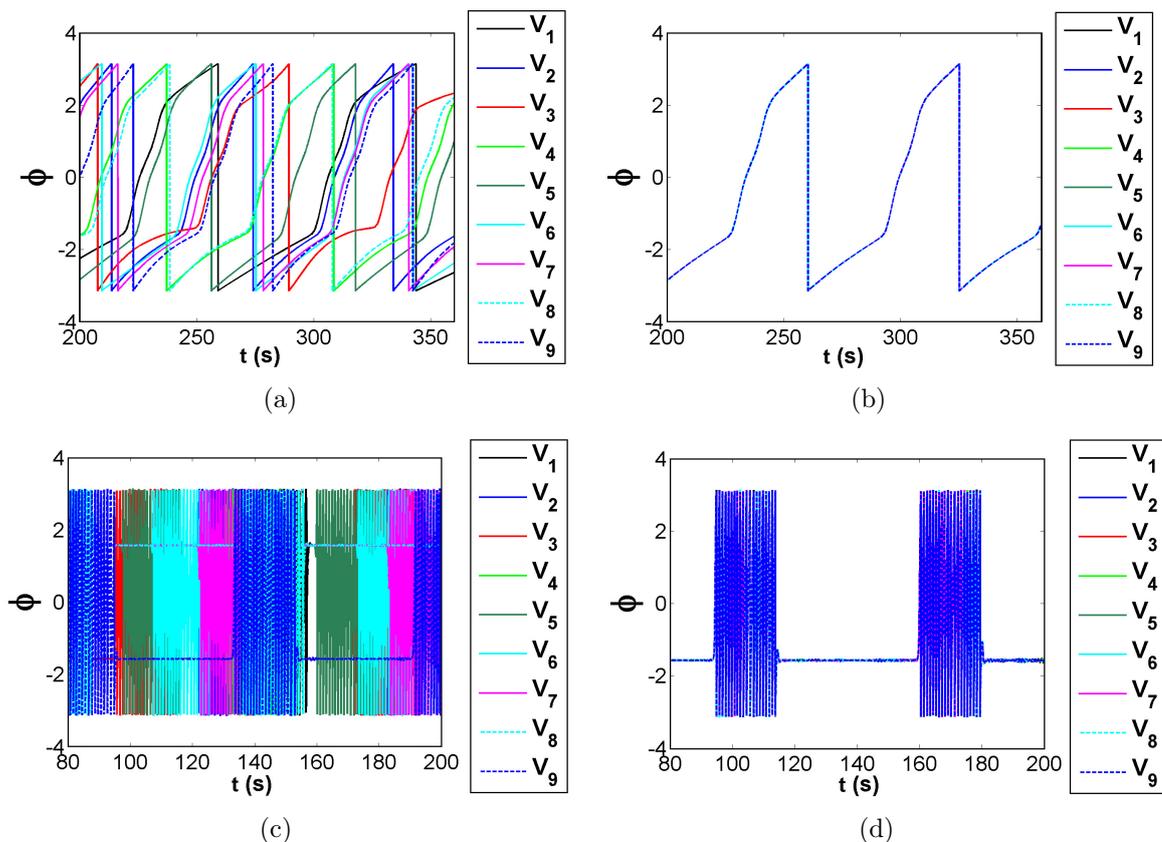


Figura 4.11: Fases extraídas dos potenciais transmembrânicos após filtragem e uso da transformada de Hilbert. Em (a) e (b) aplicamos um filtro passa-baixa com frequência de corte em 0,1 Hz. Em (c) e (d) utilizamos um filtro passa-faixa centrado em 1,0 Hz (com largura $\pm 0,1$ Hz). À esquerda $g_{gj}=0$ e à direita, $g_{gj}=2,0$ mS/cm².

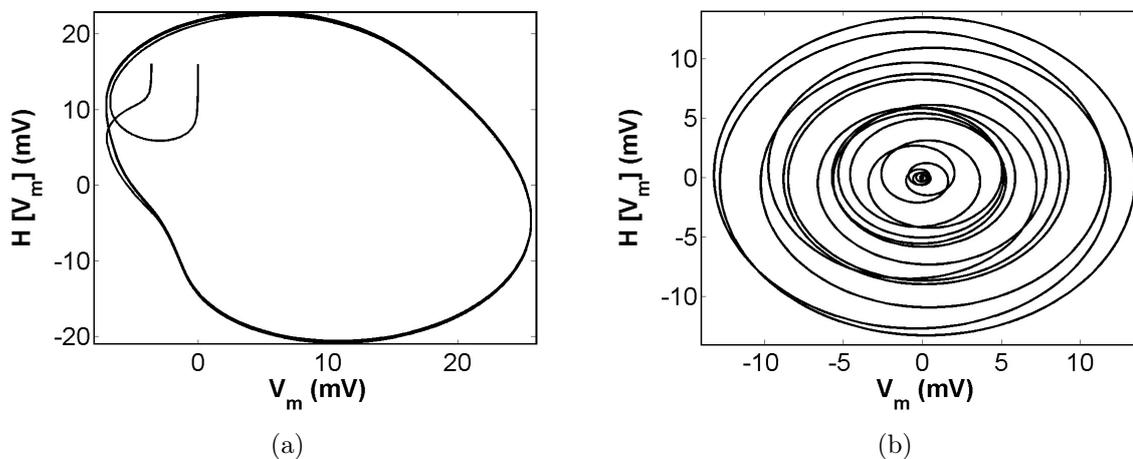


Figura 4.12: Fases representadas no plano complexo correspondentes às oscilações lentas (a) e rápidas (b).

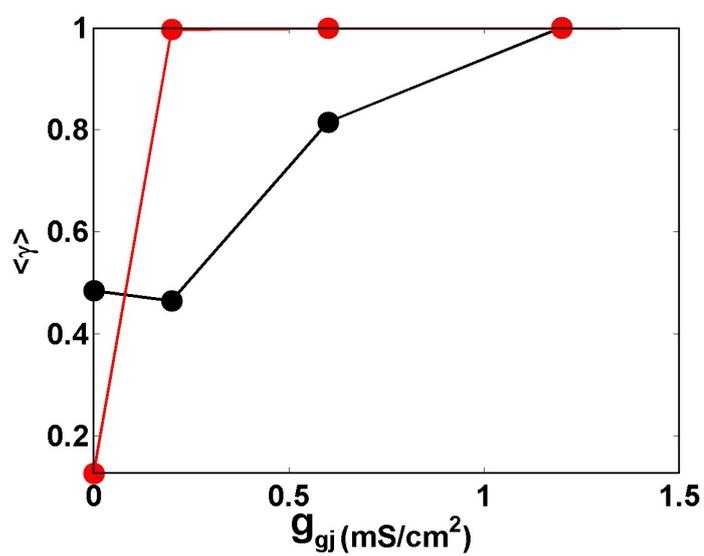


Figura 4.13: CFM em função da constante de acoplamento por GJs. A curva em vermelho ilustra o crescimento dos níveis de sincronização entre oscilações lentas e a curva em preto entre potenciais de ação.

Capítulo 5

Gap Junctions

É usual considerar, em investigações teóricas e experimentais, que GJs atuam como resistores ôhmicos (Kepler et al., 1990; Perez-Velazquez et al., 2001; Postnov et al., 2006; Sherman e Rinzel, 1991, 1992). Tal aproximação é pertinente quando as variações das CIs são desprezíveis. Neste caso, demonstra-se que a corrente originada de um processo eletrodifusivo, descrita pela equação de Nernst-Planck, reduz-se a uma corrente ôhmica (Hille, 2001; Jackson, 2006). Entretanto, durante crises epiléticas as variações de CI tanto no MI quanto no ME são intensas (figura 5.1). Há resultados experimentais corroborando uma grande elevação de $[K^+]_o$ (Fröhlich et al., 2008a), cloreto (Almeida et al., 2008; Dzhala et al., 2005; Fukuda, 2005; Koninck, 2007) e de cálcio intracelulares (Somjen, 2004). Contudo, vários resultados apontam para alterações no funcionamento de transportadores iônicos, como a Na^+/K^+ -ATPase e os cotransportes cátion-cloreto, assim como de canais iônicos, contribuindo para o aumento das CIs (Clapcote et al., 2009; Dzhala et al., 2005). Desta forma, uma questão posta é de que forma as correntes via GJs e, conseqüentemente, as propriedades decorrentes desse acoplamento, são afetados pelas alterações das CIs, nos meios intracelular e extracelular.

No modelo AENS, o acúmulo de potássio extracelular desencadeia atividades epileptiformes. Tal evento atua sobre os mecanismos transportadores resultando na mudança das CIs dos demais íons. Sendo assim, examinamos os mecanismos moduladores da $[K^+]_o$, como a variação da eletrodifusão extracelular e alteração do número de unidades funcionais na rede tridimensional. No primeiro caso, a eletrodifusão é modificada pela tortuosidade, tópico discutido nos capítulos 2 e 3. Um aumento de tortuosidade restringe a eletrodifusão, elevando $[K^+]_o$ nas vizinhanças de um dado neurônio. No segundo caso, o número de unidades funcionais controla a quantidade de K^+ enviada ao ME devido aos *bursts* epileptiformes.

A constante do acoplamento eletrotônico, k_{GJ} , um parâmetro adimensional, multiplica igualmente todas as permeabilidades iônicas nas GJs. Variamos k_{GJ} de 0 a 2,0 com intervalo de 0,25. Para $k_{GJ} = 1,0$, as permeabilidades fisiológicas de Na^+ , K^+ e Cl^- possuem

valores fisiológicos, a saber $6,73 \times 10^{-8}$ cm/s, $9,92 \times 10^{-8}$ cm/s e $1,84 \times 10^{-8}$ cm/s, respectivamente (tabela 3.2), ajustados a partir dos experimentos de MacVicar e Dudek (Almeida et al., 2008; MacVicar e Dudek, 1982).

Escolhemos valores para a tortuosidade fisiológica do ME no intervalo $1,4 \leq \lambda \leq 2,4$ (Hrabítoová e Nicholson, 2007; Syková, 2004; Syková e Nicholson, 2008). No entanto, utilizamos valores uma faixa não tabelada experimentalmente, entre 2,4 e 4,0, para investigar uma situação de impedimento severo à eletrodifusão. Deste modo, estudamos $\lambda = 1,6$; 2,0; 3,0 e 4,0.

Variamos o total de unidades funcionais na rede (denominado N) alterando o número de compartimentos nas direções x, y e z. As redes possuem 27, 45 e 125 unidades funcionais. Se $N = 27$, temos $N_x = N_y = N_z = 3$. Para $N = 45$, $N_x = N_z = 3$ e $N_y = 5$. Finalmente, $N = 125$ implica $N_x = N_y = N_z = 5$.

No tecido real, não existem neurônios, em uma dada estrutura, com propriedades e comportamentos dinâmicos individuais idênticos. Para representar a aleatoriedade intrínseca ao tecido, adicionamos contribuições randômicas às variáveis de inicialização das CIs e ao potencial de repouso, os quais variam na faixa $\pm 20\%$ com relação aos valores da tabela 3.3 (capítulo 3). Também estabelecemos variações aleatórias sobre as permeabilidades máximas de canais iônicos ($\pm 5\%$). Essas permeabilidades iônicas influenciam os tempos de disparo e freqüências de PAs (além disso, regulam a excitabilidade neuronal e concentrações extracelulares de potássio e cloreto). Aplicamos esse procedimento ao valor da permeabilidade do íon fictício A^+ produzido pelo trabalho líquido da Na^+/K^+ -ATPase, que atua como um controle sobre a atividade da bomba Na^+/K^+ . Como resultado, as freqüências e amplitudes de PAs e oscilações lentas nos *bursts* são variáveis.

5.1 Correntes do acoplamento por *gap junctions*

Comparamos as correntes pelas GJs calculadas utilizando a equação de GHK e a lei de Ohm. Tal comparação evidencia a importância da inclusão, no modelo AENS, de uma corrente eletrotônica dependente das CIs. A equação GHK (eq.(3.5), página 33) pode ser substituída pela lei de Ohm apenas quando as diferenças entre as CIs intracelulares de neurônios conectados forem desprezíveis. Isto é o caso no modelo, para uma faixa bastante restrita de parâmetros de acoplamento, total de unidades funcionais e tortuosidades. A figura 5.2, traz as correntes por GJs, assim como os PTs, para marcar os instantes de transição das fases ativas para as silenciosas. Utilizamos um filtro passa-baixa sobre todas as correntes para remover as variações rápidas durante PAs. As simulações mostram que as correntes se igualam quando $k_{GJ} > 1,25$, $\lambda \geq 3,0$ ($N = 45$; figura 5.2(f)).

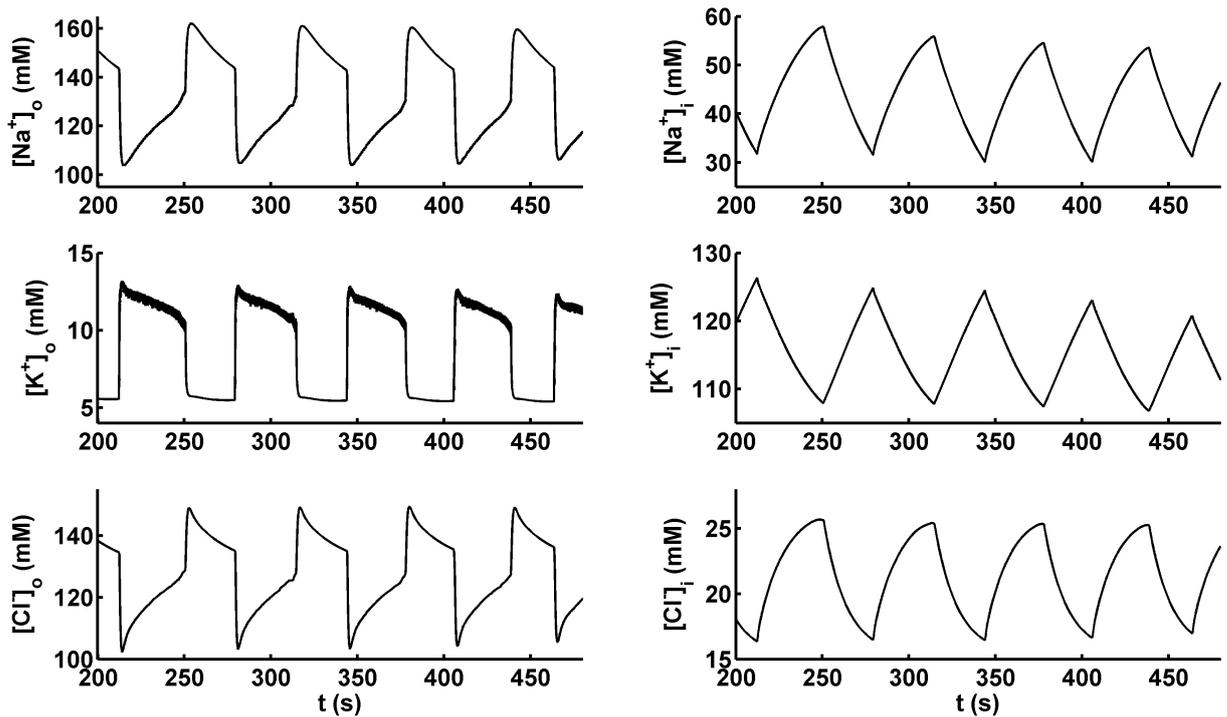


Figura 5.1: Variações das CIs intra e extracelulares do íon sódio, potássio e cloreto, no modelo AENS, em uma unidade funcional no centro da rede com $N = 125$. Fixamos o valor do acoplamento por GJs, $k_{GJ} = 1,25$ a tortuosidade do extracelular em 1,6. As condições iniciais para essas variáveis são (em mM): $[Na^+]_i = 10$; $[Na^+]_o = 131$; $[K^+]_i = 130$; $[K^+]_o = 4,0$; $[Cl^-]_i = 9,0$; $[Cl^-]_o = 130$.

5.2 Padrões de disparo

Simulamos PTs e potenciais extracelulares, densidades de corrente e concentrações por um tempo igual a 1000 s, usando um passo de tempo Δt igual a 1,0 ms (capítulo 3). Primeiramente, estudamos mudanças nos padrões de disparo usando uma inspeção qualitativa da forma e frequência de PTs. Na figura 5.3 observamos PTs de um neurônio típico da rede com $N = 45$ unidades funcionais para dois valores de tortuosidade ($\lambda = 1,6$ e 4,0) e os acoplamentos $k_{GJ} = 0; 1,25$ e 2,0. Mais especificamente, ilustramos um período do *burst* (figuras 5.3(a), 5.3(b)), nos quais os PAs caminham sobre uma linha de base despolarizada. Na figura 5.3(c) detalhamos o início da fase ativa do segundo *burst* da figura 5.3(a). Existe a tendência ao aumento da duração da fase ativa quando elevamos os valores de λ e de k_{GJ} . Os *bursts* trazem amplitudes variáveis que tendem a decrescer no início da fase ativa, especialmente para valores elevados de tortuosidade. Nas figuras 5.3(a), 5.3(b), para $k_{GJ} = 2,0$, o aumento de λ de 1,6 para 4,0 provoca uma redução de cerca de 76% nas amplitudes dos PAs. O efeito é maior aumentando-se N . Na figura 5.4(a) (na qual $N = 125$) observamos o decréscimo de amplitude quando a constante de acoplamento tem valor igual a 2,0. Elevando-se a tortuosidade, de $\lambda = 1,6$ para 4,0, o decréscimo de amplitude é tão intenso que as amplitudes reduzidas não ultrapassam

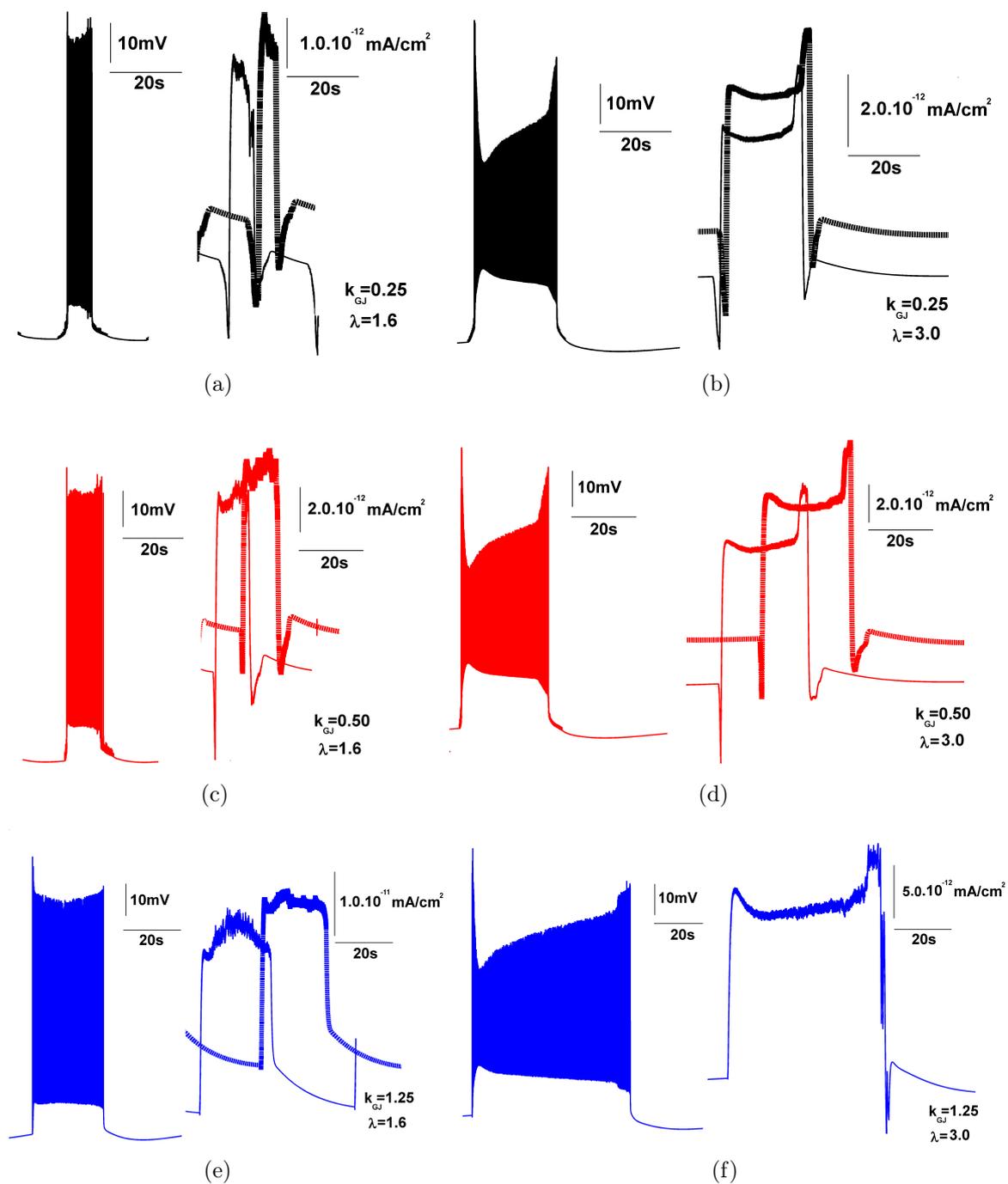


Figura 5.2: PTs, correntes pelas GJS descritas pela equação de GHK e Lei de Ohm (linhas tracejadas e grossas). $N = 45$, $k_{GJ} = 0,25$ (preto); $0,50$ (vermelho); $1,25$ (azul), $\lambda = 1,6$ (esquerda) and $3,0$ (direita). As correntes são iguais se $k_{GJ} \geq 1,25$ e $\lambda \geq 3,0$ (f).

2,0mV (figura 5.4(b), $\lambda = 4,0$ e $k_{GJ} = 2,0$).

5.2.1 Períodos do *burst* e frequências dos potenciais de ação

Definimos o período de um *burst* como a soma entre as durações das fases ativa e silenciosa. Usando um limiar sobre os PTs, calculamos o período médio de um *burst*, pois para cada série temporal de PTs, há vários *bursts*. Aplicando o mesmo limiar, estimamos a frequência média de PAs em um *burst*. Tomamos oito amostras de PTs gerados sob condições aleatórias para fazer uma segunda média de tais quantidades, expressas como $\langle \text{média} \rangle \pm$ erro padrão, onde as chaves indicam média sobre desordem. Referimo-nos, portanto, ao símbolo $\langle T_{burst} \rangle$ para denominar o período médio de um *burst* calculado sobre a desordem. A média sobre desordem das frequências de PAs por *burst* ganha o símbolo $\langle f_{spike} \rangle$.

Para verificar claramente o efeito do acoplamento por GJs sobre as frequências, escolhemos, aleatoriamente, neurônios situados nas fronteiras com a solução de perfusão e no centro da rede (pares não são adjacentes). Calculamos $\langle T_{burst} \rangle$ e $\langle f_{spike} \rangle$ para $N = 45$ e $\lambda = 1,6; 2,0; 3,0$ e $4,0$ (figura 5.5). Não observamos diferenças qualitativas significativas quando mudamos a posição do ponto de observação na rede. Há crescimento de $\langle T_{burst} \rangle$ com o aumento da tortuosidade e um ponto de mínimo em torno do valor $k_{GJ} = 0,25$ (figuras 5.5(a), 5.5(c), 5.5(d)). O valor mais elevado de $\langle T_{burst} \rangle$, para $k_{GJ} = 2,0$ e $\lambda = 4,0$, mede 331 ± 18 s. As curvas de $\langle f_{spike} \rangle$ apresentam pontos de máximo que se deslocam mudando-se a tortuosidade (figuras 5.5(b), 5.5(d), 5.5(f)).

Modificando o tamanho da rede, mantendo-se a tortuosidade fixa, observamos um padrão semelhante ao da figura 5.5. Escolhemos, desta vez, o neurônio central (mais uma vez não há diferenças qualitativas alterando-se o ponto de observação na rede). Na figura 5.6, $\lambda = 2,0$ e $N = 27, 45$ e 125 . As curvas de $\langle T_{burst} \rangle$ (figura 5.6(a)) apresentam mínimo em $k_{GJ} = 0,25$, sendo a curva correspondente a $N = 125$ a que possui os períodos mais largos; além disso, a trajetória não se cruza com as demais, as quais se interceptam no intervalo $k_{GJ} < 1,0$. As curvas de $\langle f_{spike} \rangle$ apresentam máximos em $k_{GJ} = 0,75$, para $N = 27$ e 45 . Em $N = 125$, o ponto de máximo se desloca na direção crescente da constante de acoplamento (figura 5.6(b)).

Concluindo, a variação do acoplamento por GJs modifica as frequências médias de *bursts* e PAs. Tratando-se do período médio de *bursts*, há o crescimento monotônico com k_{GJ} , modulado pela tortuosidade. Um aumento gradual de λ , produz elevação também gradual dos períodos médios. As frequências dos PAs apresentam pontos de máximo, os quais variam a depender do valor da tortuosidade. Uma visão mais clara dessas tendências é ilustrada pelas figuras 5.7 e 5.8. Nessas figuras representamos $\langle T_{burst} \rangle$ no espaço de parâmetros formado por k_{GJ} e λ , utilizando uma escala de cinzas. O período médio de um *burst* possui valores superiores em intervalos de k_{GJ} que diminuem quando elevamos

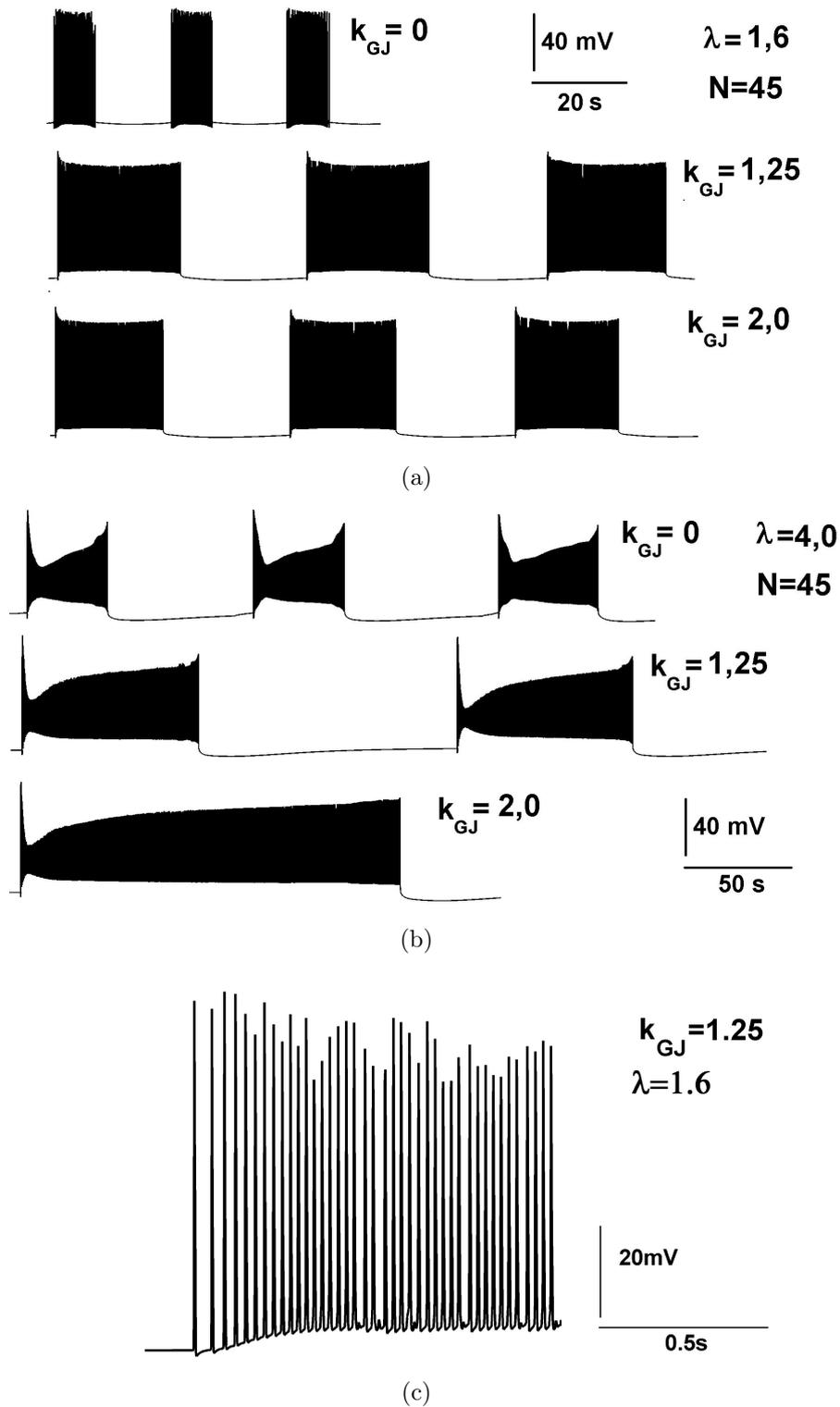


Figura 5.3: PTs de um neurônio típico da rede com $N = 45$ unidades funcionais e três valores do acoplamento por GJs: $k_{GJ} = 0; 1,25; 2,0$. O conjunto de condições aleatórias sobre condições iniciais e permeabilidades é o mesmo em (a)-(c). Os gráficos ilustram um período do *bursting* com destaque para a fase ativa. Observa-se uma tendência ao aumento da duração da fase ativa elevando-se o valor de k_{GJ} ou da tortuosidade de 1,6 (a) para 4,0(b). Em (c) o detalhe do início de uma fase ativa mostra uma seqüência de PAs caminhando sobre a linha de base despolarizada ($\lambda = 1,6$ e $k_{GJ} = 1,25$).

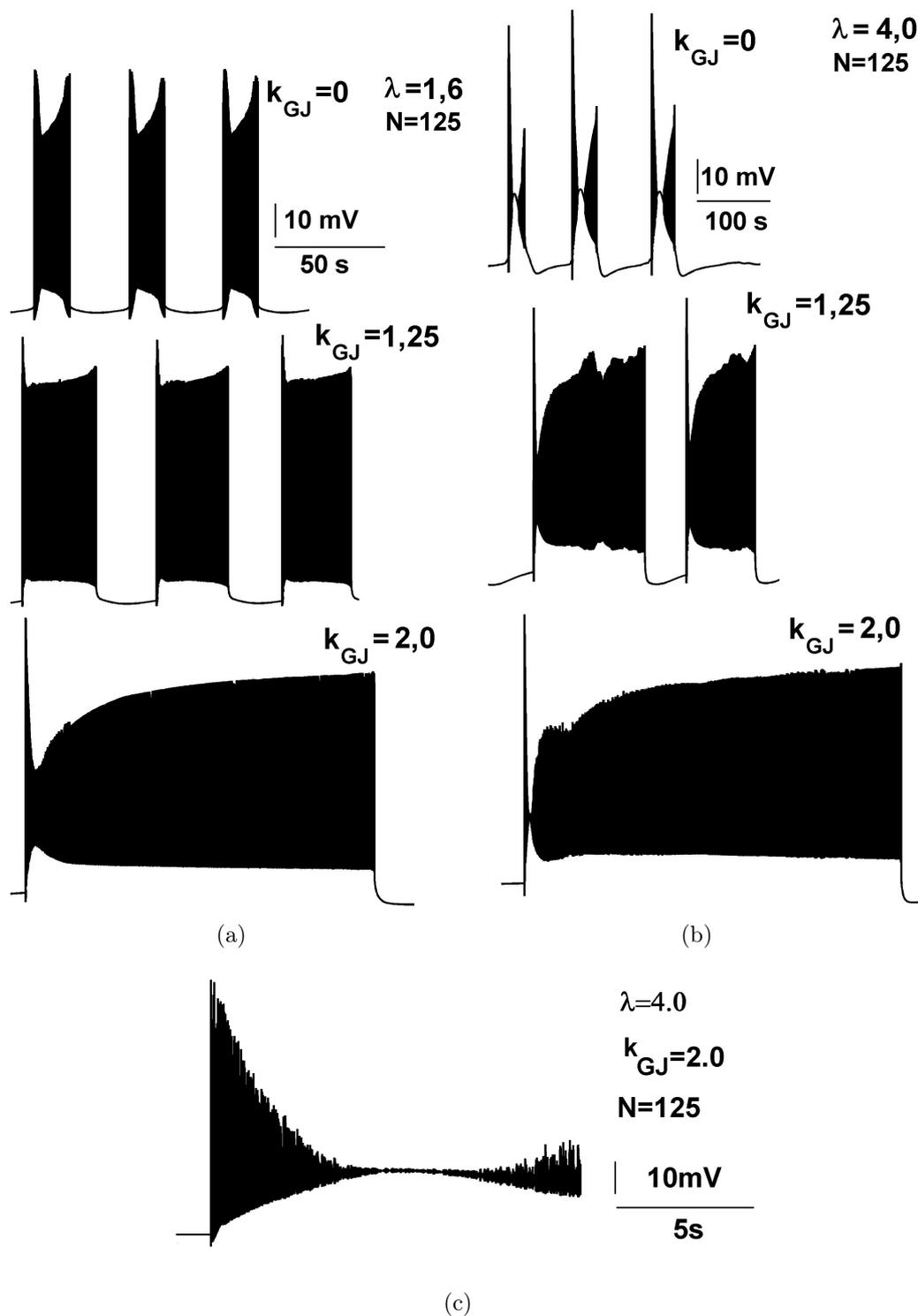


Figura 5.4: *Bursts* nos PTs de um neurônio típico da rede com $N = 125$ unidades funcionais para $k_{GJ} = 0; 1,25; 2,0$ e $\lambda = 1,6$ (a) e $4,0$ (b). Utilizamos o mesmo conjunto de condições aleatórias sobre condições iniciais e permeabilidades da figura 5.1. Observa-se, como na figura 5.3, uma tendência ao aumento da duração da fase ativa elevando-se k_{GJ} . A redução da amplitude dos PAs, no início do *burst*, torna-se dramática com o crescimento da tortuosidade (b). Em (c) temos um detalhamento do início da fase ativa para $k_{GJ} = 2,0$ e $\lambda = 4,0$. As amplitudes reduzidas não ultrapassam 2,0 mV.

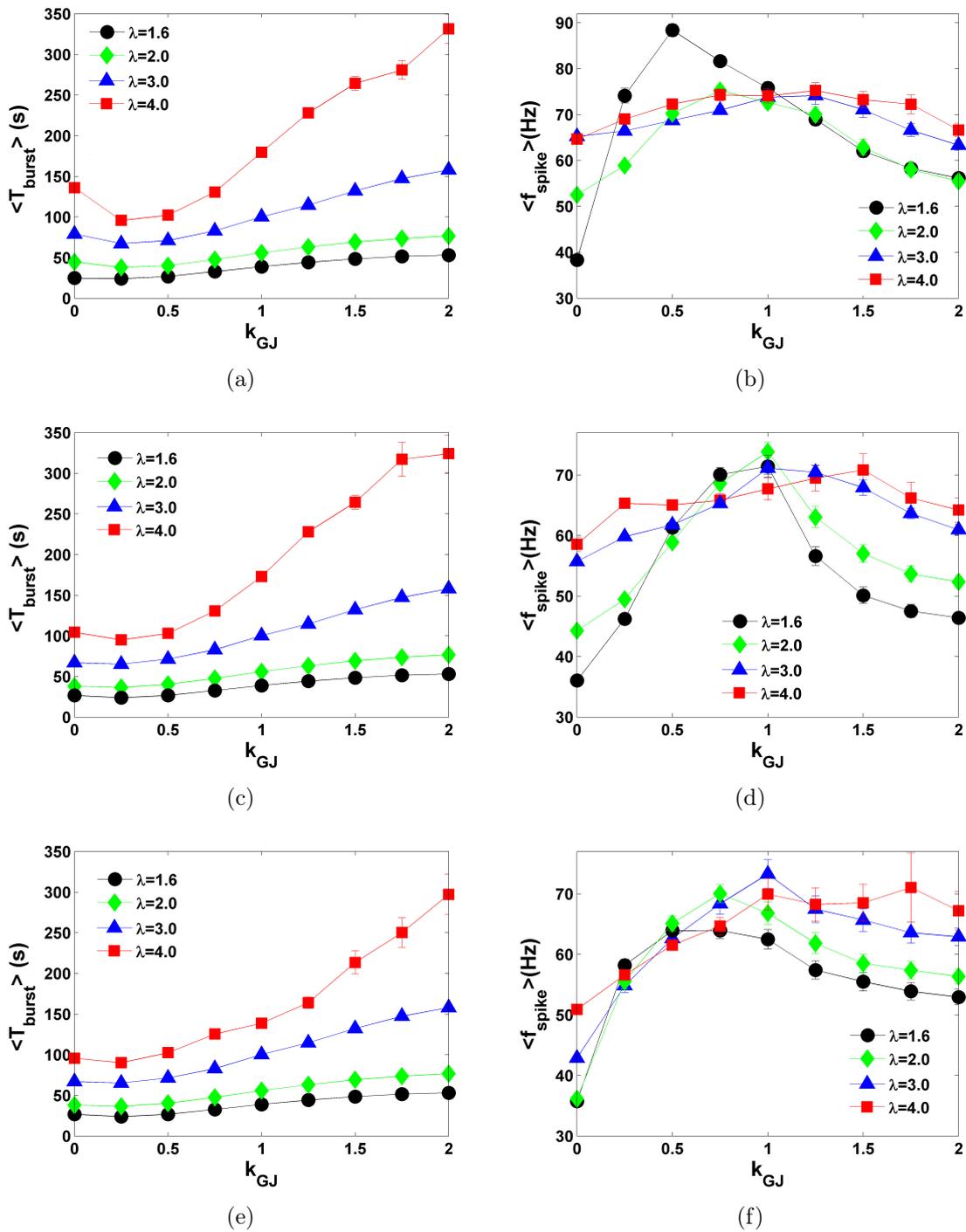


Figura 5.5: $\langle T_{burst} \rangle$ e $\langle f_{spike} \rangle$ ($N = 45$) em função do acoplamento por GJs do neurônio central (A,B) e dois outros escolhidos aleatoriamente, próximos às fronteiras com a solução de perfusão (c),(d) e interface gás-líquido (e),(f). Fixamos as tortuosidades em $\lambda = 1,6$ (círculos); 2,0 (diamantes); 3,0 (triângulos) e 4,0 (quadrados). Em (a),(c) e (e) não observamos diferenças qualitativas entre $\langle T_{burst} \rangle$; os períodos crescem com os valores de k_{GJ} e de λ . Há pontos de mínimo em torno do valor $k_{GJ} = 0,25$. Nos gráficos de $\langle f_{spike} \rangle$, (b), (d) e (f), observamos um máximo na frequência que se desloca com o valor de tortuosidade e difere a depender da posição do neurônio na rede. Não há diferenças qualitativas significativas. As grandezas são expressas como $\langle \text{média} \rangle \pm$ erro padrão. Em algumas curvas as barras de erro são menores do que os símbolos.

o total de unidades funcionais (figura 5.7). Esta região, de valores elevados de $\langle T_{burst} \rangle$, corresponde a tortuosidades maiores do que 3,0. Para $N = 27$ e 45, as frequências de disparo de PAs exibem valores superiores nas regiões $0,25 < k_{GJ} < 1,25$ e $\lambda < 2,5$. Para $N = 125$, há uma segunda região, no mesmo intervalo de k_{GJ} e $\lambda > 3,5$. A primeira região se reduz, abarcando o intervalo $\lambda < 2,0$ (figura 5.8).

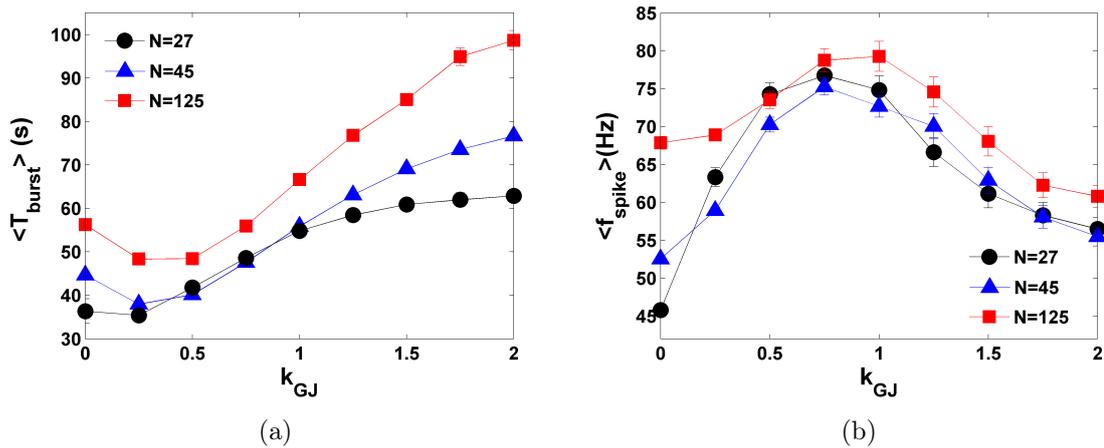


Figura 5.6: $\langle T_{burst} \rangle$ (a) e $\langle f_{spike} \rangle$ (b) versus k_{GJ} para $\lambda = 2,0$ e três tamanhos de rede ($N = 27$ (círculos), 45 (triângulos), 125 (quadrados)). As curvas são qualitativamente semelhantes aos gráficos da figura 5.5.

A dinâmica das correntes de sódio afeta a transição entre as fases ativa e silenciosa do *bursting*, e, portanto, controla a sua duração (veja capítulo 3, seção 3.3). Observamos mudanças nessa dinâmica alterando a força de acoplamento por GJs e a tortuosidade. Na figura 5.9, mostram-se as densidades dos fluxos de sódio, pelos canais iônicos dependentes de voltagem e pela bomba- Na^+/K^+ do neurônio central. A figura permite localizar os instantes de tempo nos quais os fluxos de Na^+ se interceptam marcando as transições de uma fase ativa para uma fase silenciosa.

Densidades de fluxo positivas indicam saída de sódio do MI para o ME (como os fluxos pela bomba- Na^+/K^+). Para construir a figura, invertamos o sinal do fluxo pelos canais, para permitir o cruzamento dessas curvas com as curvas dos fluxos de saída de sódio pela Na^+/K^+ -ATPase. Além disso, usamos um filtro passa-baixa para eliminar as variações rápidas dos fluxos durante PAs, melhorando a visualização. Cada par de densidades de fluxo tem uma mesma cor indicando um valor distinto de k_{GJ} . Todas as curvas foram deslocadas para que se iniciassem no mesmo instante de tempo, possibilitando melhor visualização das diferenças em amplitude e duração. Os cruzamentos entre os fluxos (círculos vermelhos) marcam uma transição para a fase silenciosa, cada qual correspondente a um valor distinto de k_{GJ} . Esses pontos são unidos por linhas de tendência (em vermelho).

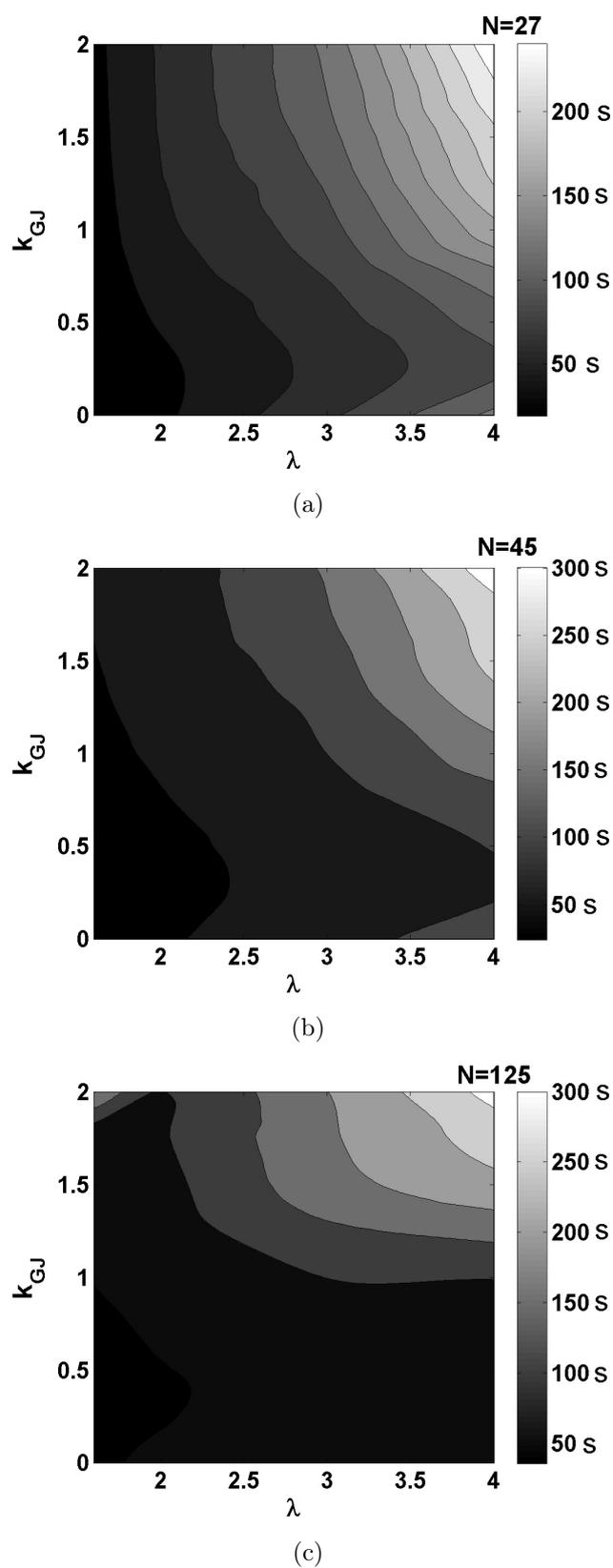
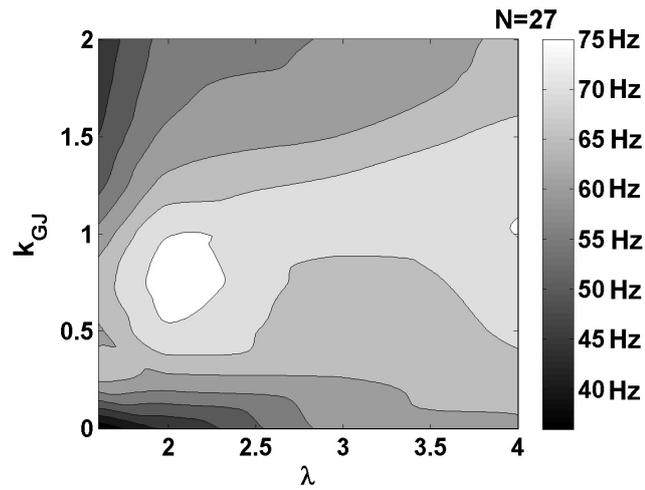
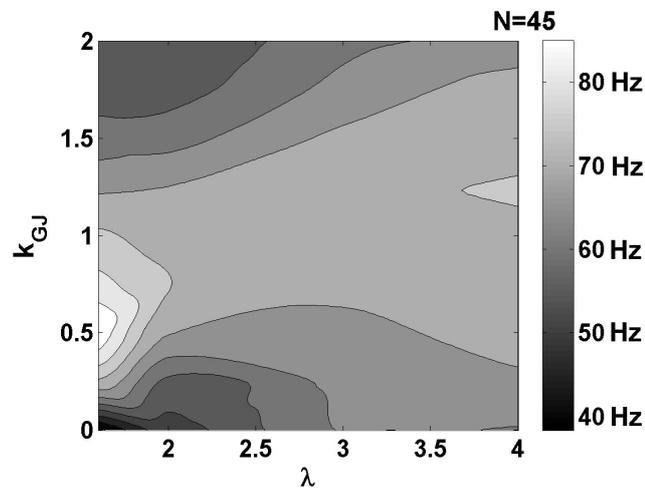


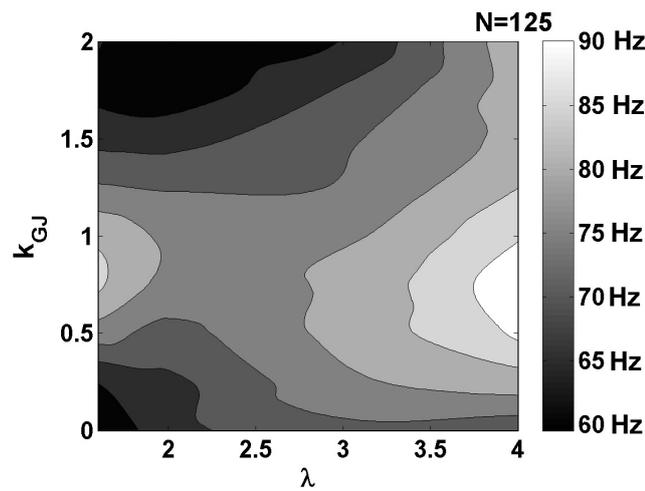
Figura 5.7: Representação em escala de cinzas das modificações de $\langle T_{burst} \rangle$ no espaço de parâmetros formado por k_{GJ} e λ . $\langle T_{burst} \rangle$ assume os valores mais elevados nas regiões $\lambda > 3,0$ e $k_{GJ} > 0,25$ ($N = 27$), $k_{GJ} > 0,5$ ($N = 45$) e $k_{GJ} > 1,0$ ($N = 125$).



(a)



(b)



(c)

Figura 5.8: Representação em escala de cinzas das modificações de $\langle f_{spike} \rangle$ no espaço de parâmetros formado por k_{GJ} e λ . Para $N = 27$ e 45 , $\langle f_{spike} \rangle$ exibem valores mais elevados nas regiões $0,25 < k_{GJ} < 1,25$ e $\lambda < 2,5$. Para $N = 125$, a região é menor ($\lambda < 2,0$) e há uma segunda região, tendo o mesmo intervalo de k_{GJ} e $\lambda > 3,5$.

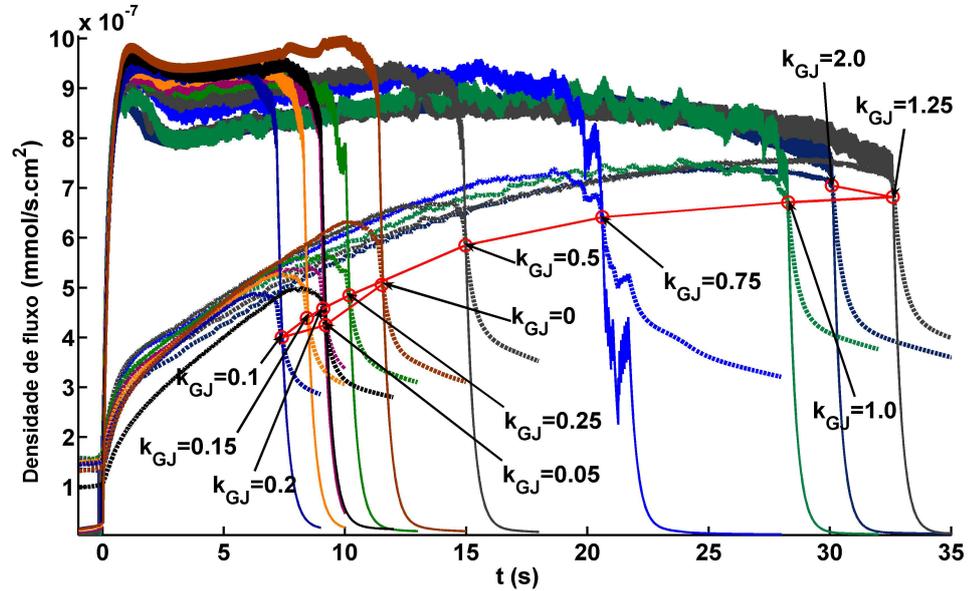
No intervalo $0 \leq k_{GJ} \leq 0,1$ (figuras 5.9(a) e 5.9(b)) o crescimento de k_{GJ} se associa ao decréscimo do instante de tempo de cruzamento entre fluxos. Isto indica uma redução do período médio do *burst* naquele intervalo.

O menor tempo de transição ocorre quando $k_{GJ} = 0,1$. O aumento da tortuosidade de 2,0 para 3,0 estende a duração dos *bursts* e os pontos de transição com menores valores de k_{GJ} se localizam no intervalo $20 \text{ s} < t < 30 \text{ s}$ (figura 5.9(b); para $\lambda = 2,0$ o intervalo é de $5 \text{ s} < t < 17 \text{ s}$, figura 5.9(a)). Além disso, o aumento de λ torna os pontos de transição no intervalo $0 \leq k_{GJ} \leq 0,25$ mais próximos, o que corresponde a uma variação suavizada de $\langle T_{burst} \rangle$. A figura 5.9 fornece uma pista para interpretar o comportamento das curvas de períodos e freqüências. Deste modo, não pretendemos estabelecer uma correspondência direta entre as figuras 5.5, 5.6, 5.9, já que as primeiras ilustram médias sobre vários *bursts* numa série temporal e sobre diversas configurações aleatórias, enquanto que a figura 5.9 representa o comportamento de uma única amostra escolhida aleatoriamente.

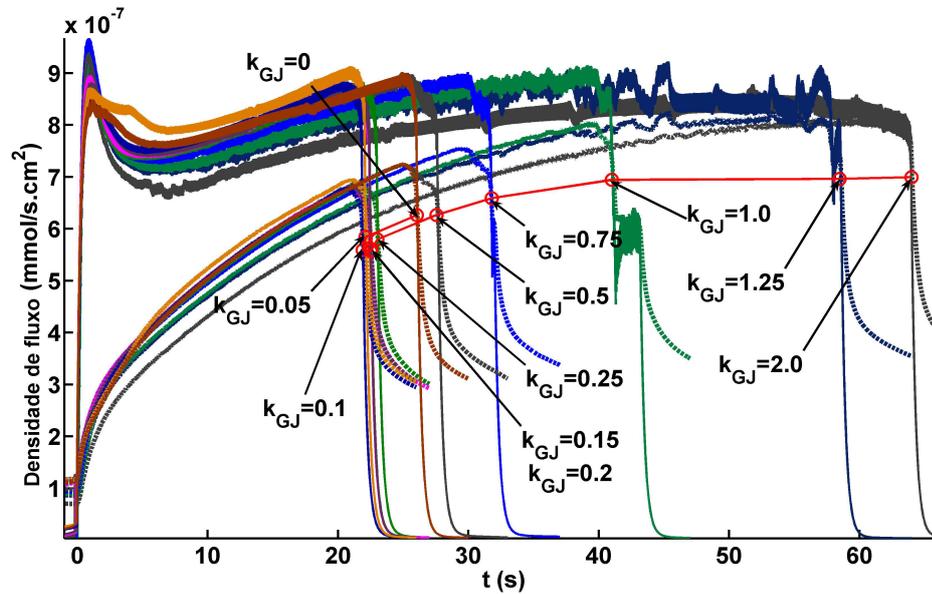
As mudanças nas freqüências médias de PAs podem ser entendidas observando-se as alterações dos tempos de disparo de *spikes* em um par de neurônios acoplados (figuras 5.10). No par desacoplado, não há dependências entre os tempos de disparo (figura 5.10(a)). Com o acoplamento, os disparos do primeiro neurônio, mais despolarizado (figura 5.10(b), em preto) induzem a despolarização do segundo (figura 5.10(b) em vermelho). Acoplamentos mais intensos convertem as despolarizações de pequenas amplitudes em PAs (figuras 5.10(c) e 5.10(d)). Os *spikes* transmitidos, denominados prepotenciais rápidos (Perez-Velazquez et al., 1994) elevam o número de PAs em um dado *burst* e, portanto, alteram a freqüência de disparos dentro de um *burst*. Acoplamentos mais intensos, além de modificarem as freqüências dos PAs em um *burst*, sincronizam os disparos (figuras 5.10(e) e 5.10(f)).

5.3 Sincronização

Para estudar a sincronização de fase entre *spikes*, realizamos extrações de fases via transformada de Hilbert, a qual requer a aplicação de um filtro sobre as séries temporais, conforme discutido no capítulo 4. Para determinar o conteúdo de freqüências nas séries temporais usamos o espectro de potências e obtivemos duas faixas: para oscilações rápidas (PAs) $52 \pm 2 \text{ Hz}$ e para oscilações lentas (envoltórias dos *bursts*) freqüências abaixo de 1 Hz (figura 5.11). Tais faixas são observadas em todos os PTs simulados; além disso, satisfazem ao critério de fase de banda estreita (Chavez et al., 2006). Fizemos o gráfico da série temporal de um PT contra a sua transformada de Hilbert para mostrar que não há centros de rotação bem definidos se a série não é filtrada (figura 5.12). Aplicando o filtro passa-baixa ou passa-faixa os centros de rotação se tornam definidos. Nas figuras 5.12(b), 5.12(e) é possível definir um centro de rotação único. Todavia, as formas das trajetórias não correspondem às curvas fechadas simples como nas figuras 5.12(c), 5.12(f). Isto acontece



(a)



(b)

Figura 5.9: Cruzamento das densidades de fluxos de Na⁺ pelos canais iônicos dependentes de voltagem (linhas sólidas) e a bomba-Na⁺/K⁺ (linhas tracejadas) do neurônio central ($N = 45$). Cada cruzamento marca uma transição para o período silencioso, correspondente a um valor de k_{GJ} . Os cruzamentos são unidos por uma linha de tendência (em vermelho). Em (a) $\lambda = 2,0$ e em (b) $\lambda = 3,0$.

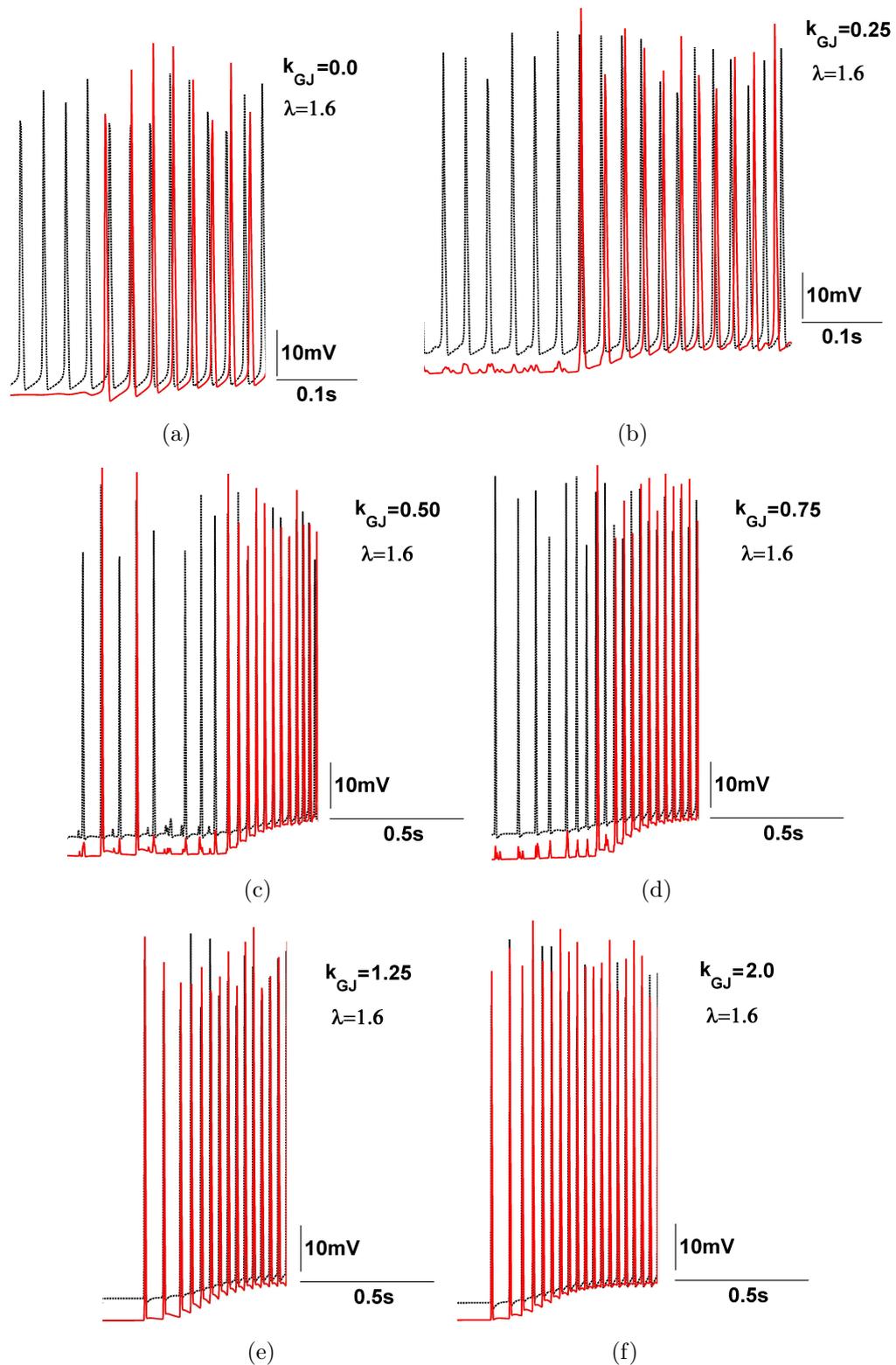


Figura 5.10: Mudanças no tempo de disparo de PAs em um par típico de neurônios acoplados ($N = 45$, $\lambda = 1,6$ e $k_{GJ} = 0$ (a); 0,25 (b); 0,50 (c); 0,75 (d); 1,25 (e) e 2,0 (f)). O aumento gradual da força de acoplamento por GJs primeiro induz despolarizações de pequenas amplitudes, no neurônio menos despolarizado (em vermelho); segundo, induz o disparo de PAs e terceiro, estabelece sincronização entre PAs. O aumento do número de *spikes* em um *burst* do segundo neurônio provoca a variação de $\langle f_{spike} \rangle$. As escalas verticais são as mesmas em todas as figuras.

porque a frequência de corte 1 Hz engloba frequências abaixo deste valor. Desta forma, para uma análise mais rigorosa deve-se escolher uma frequência de corte menor para filtrar as oscilações lentas.

Após a remoção das médias das séries temporais, o filtro digital utilizado é do tipo resposta de impulso finita de ordem $N-1$ o qual não distorce as fases (Oppenheim et al., 1999). O cálculo da transformada de Hilbert usa uma integração de uma função da série temporal sobre um intervalo de tempo infinito. Já que as séries temporais neste estudo são finitas, seus valores de fase, no início e fim da série temporal são espúrios. Desta forma, descartamos 10% dos valores instantâneos das fases, correspondentes ao início e fim das séries temporais, para calcular a CFM. Para atender à aleatoriedade imposta à rede, calculamos a média da CFM sobre oito amostras de configurações aleatórias e a expressamos como $\langle \text{média} \rangle \pm \text{erro padrão}$, onde as chaves denotam média sobre a desordem. Se as fases foram extraídas a partir do filtro passa-baixa (faixa), referimo-nos à CFM em baixa (alta) frequência.

O aumento da força de k_{GJ} tende a igualar as formas de *spikes* (figura 5.10) e *bursts*, portanto induzindo a sincronização completa de amplitudes e tempos de disparos. Analisamos a sincronização examinando o comportamento da CFM em alta e baixa frequência (figuras 5.13, 5.14). Usando $N = 45$, $\lambda = 1,6; 2,0; 3,0$ e $4,0$, escolhemos pares de neurônios acoplados em algumas posições distintas na rede: um par no centro e outro em um plano de fronteira com a solução de perfusão, não adjacentes. A CFM em baixa frequência (figuras 5.13(a) e 5.13(b)) acusa níveis de sincronização maiores do que 0,8 e 0,5 para os pares central e de fronteira, respectivamente ($k_{GJ} = 0$). O aumento de λ induz crescimento da CFM, mas se $k_{GJ} > 1,0$ a diferença entre os valores da CFM para tortuosidades distintas é menor do que 5%. Os gráficos da CFM em alta frequência (figuras 5.13(c) e 5.13(d)) mostram sincronização aumentada para todo λ , não havendo diferenças qualitativas importantes entre os pares do centro e da fronteira. Para $k_{GJ} > 1,0$ os valores da CFM em alta frequência crescem nesta ordem: $\lambda = 1,6; 4,0; 2,0$ e $3,0$ em ambos os pares, sendo a faixa de variação da CFM maior para $\lambda > 3,0$. A CFM em baixa frequência do par na fronteira, figura 5.13(b) exibe valores inferiores aos do par central (figura 5.13(a)), especialmente se $\lambda = 1,6$. Os efeitos de borda, i.e., a proximidade da solução de perfusão, é um fator de redução da sincronização em baixa frequência, pois o potássio da solução de banho favorece a heterogeneidade neuronal.

Na figura 5.14, ilustra-se o que acontece à CFM (no par central) modificando o tamanho da rede. Quanto maior N , maior o valor da CFM em todas as faixas de frequência estudadas (tais gráficos são qualitativamente similares às curvas da figura 5.13). O índice de baixa frequência (figura 5.14(a)) exibe um nível basal, i.e. $k_{GJ} = 0$, acima de 0,8 para todos os valores de N . Nas figuras 5.14(a), 5.14(b) mostra-se o crescimento monotônico da sincronização com k_{GJ} , no intervalo das barras de erro.

Inspecionamos os potenciais de campo extracelulares simulados (PCEs), medidos no

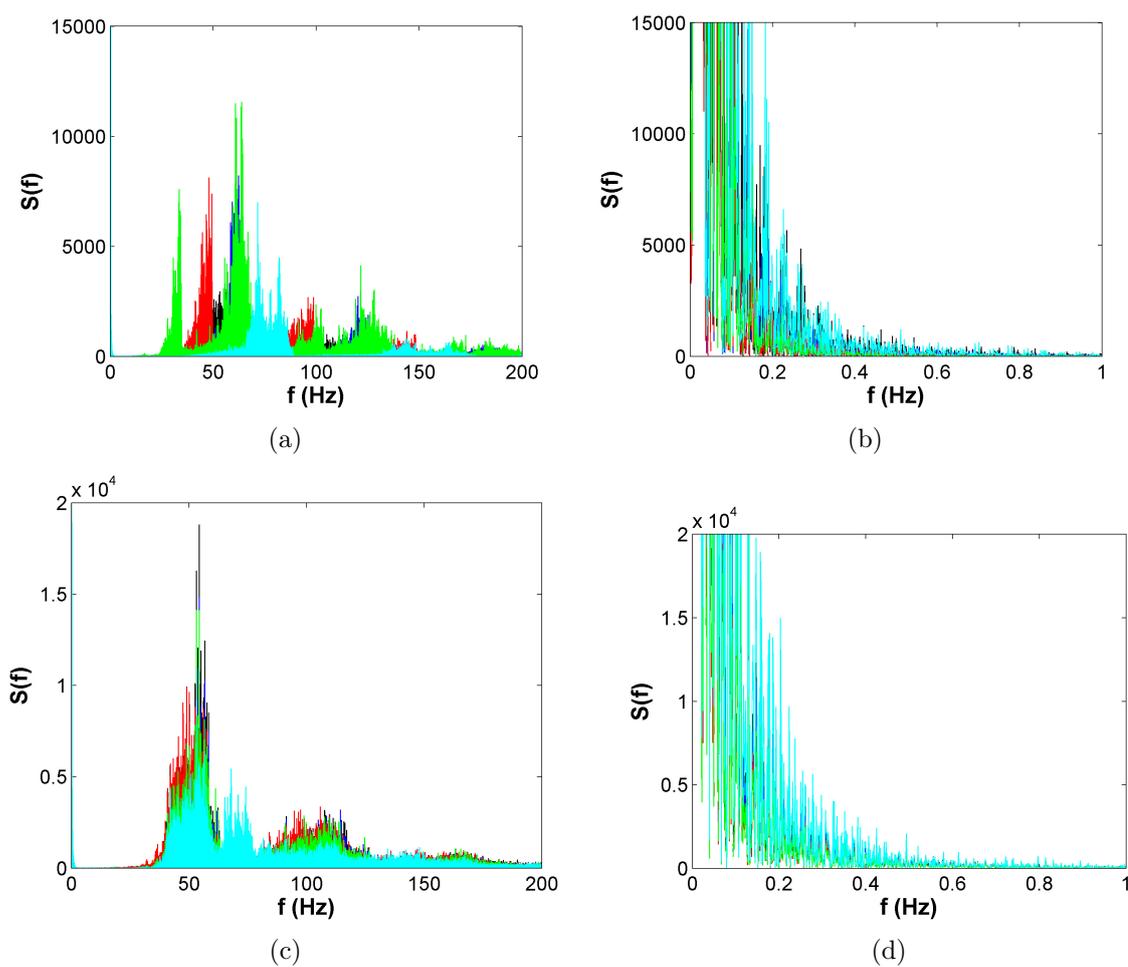


Figura 5.11: Espectro de potências dos PTs simulados ($N = 27$ e $\lambda = 3,0$). Em (a),(b) $k_{GJ} = 0$ e em (c), (d) $k_{GJ} = 1,25$. Esses padrões são semelhantes para todos os demais parâmetros.

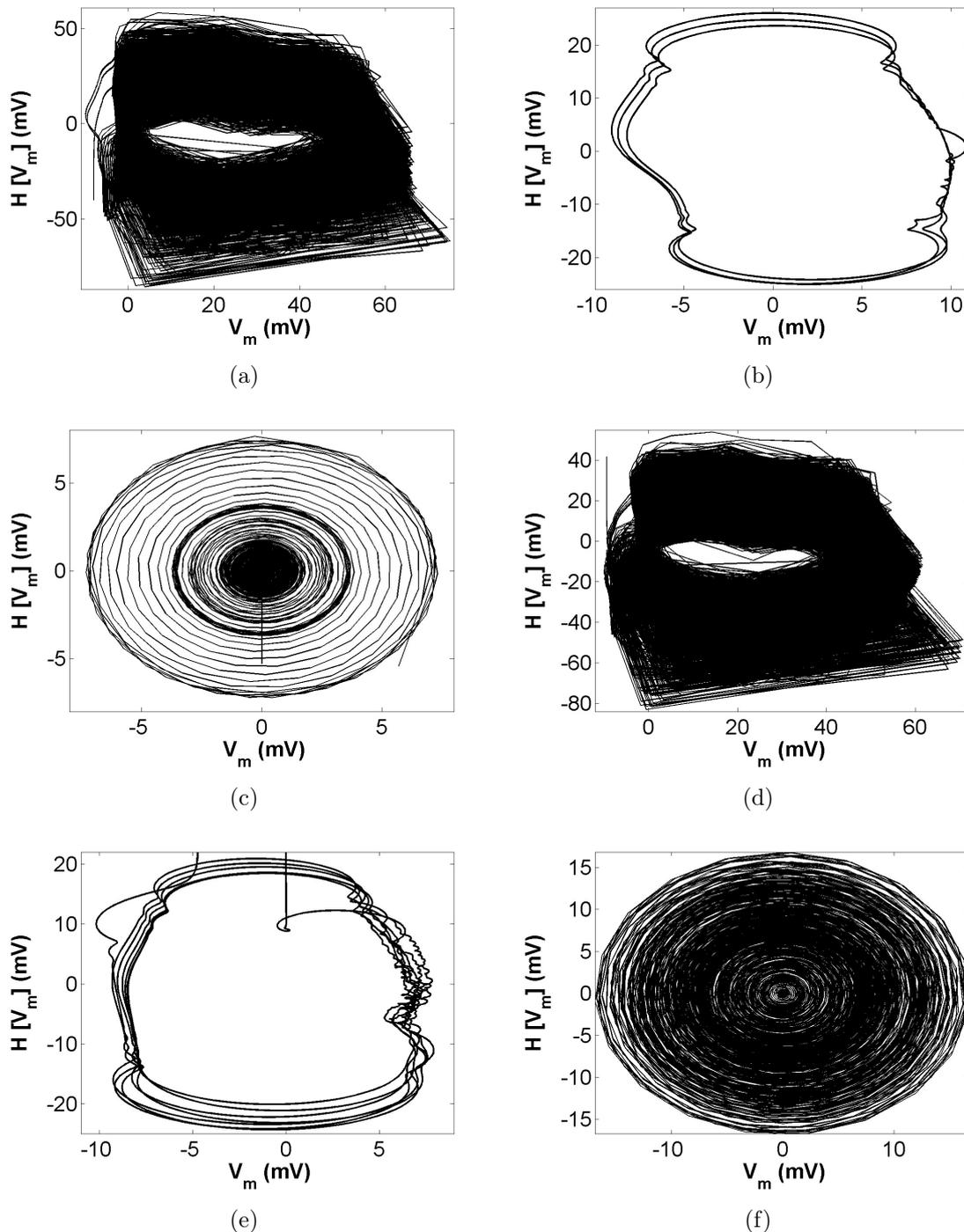


Figura 5.12: Representação no plano complexo do PT de um neurônio típico. Em (a)-(c) $N = 45$ e $\lambda = 2,0$. Em (d)-(f) $N = 125$ e $\lambda = 1,6$. (a) e (d) ilustram cerca de três ciclos do PT não filtrado. (b) e (e) trazem também três ciclos nos quais aplicamos o filtro passa-baixa do tipo FIR com preservação das fases e corte em 1 Hz. Em (c) e (f) uma seqüência de PAs em um *burst* foi tratada usando o filtro passa-faixa do mesmo tipo centrado em 52 ± 2 Hz. Aplicando o filtro passa-baixa ou passa-faixa os centros de rotação se tornam definidos.

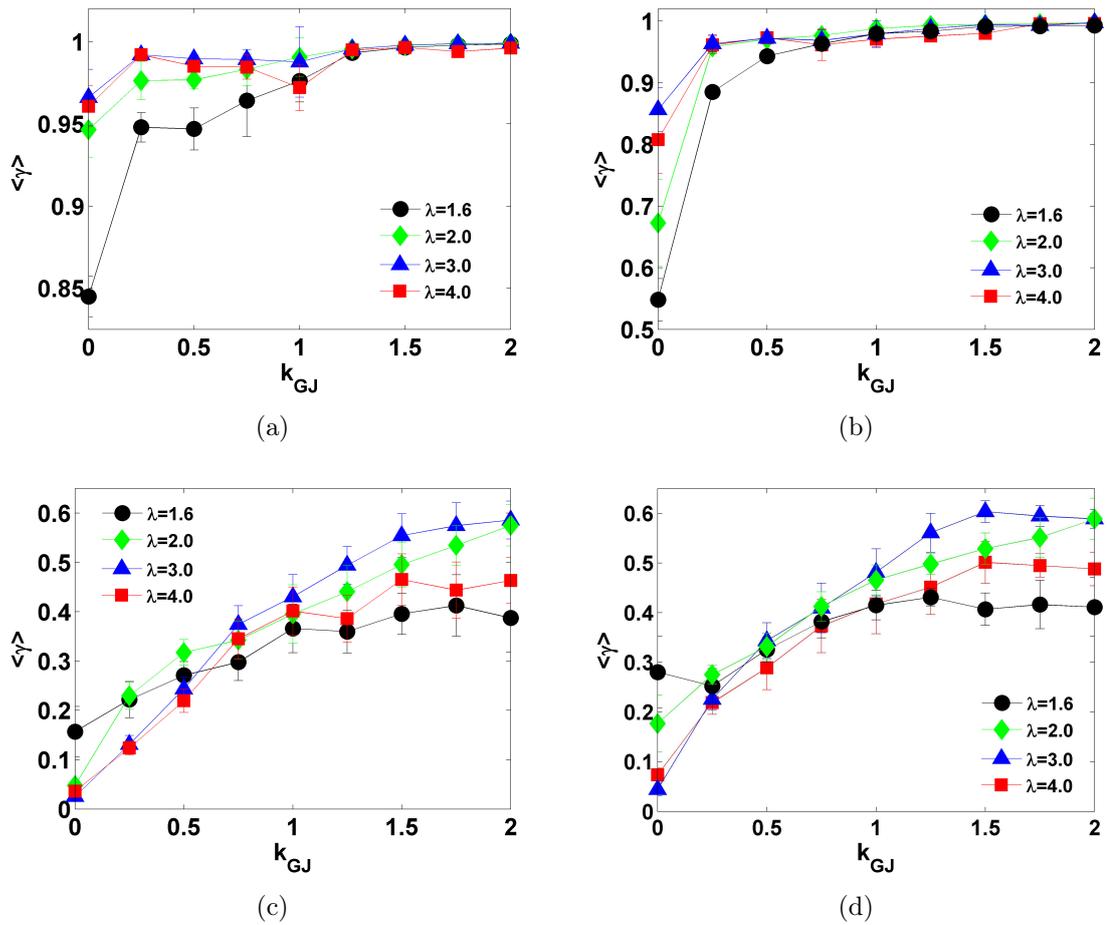


Figura 5.13: CFM do par central (esquerda) e par na fronteira (direita). As tortuosidades têm os valores $\lambda = 1,6$ (círculos); $2,0$ (diamantes); $3,0$ (triângulos); $4,0$ (quadrados) e $N = 45$.(a) e (b) CFM em baixa frequência.(c) e (d) CFM em alta frequência. Em algumas curvas as barras de erro são menores do que os símbolos.

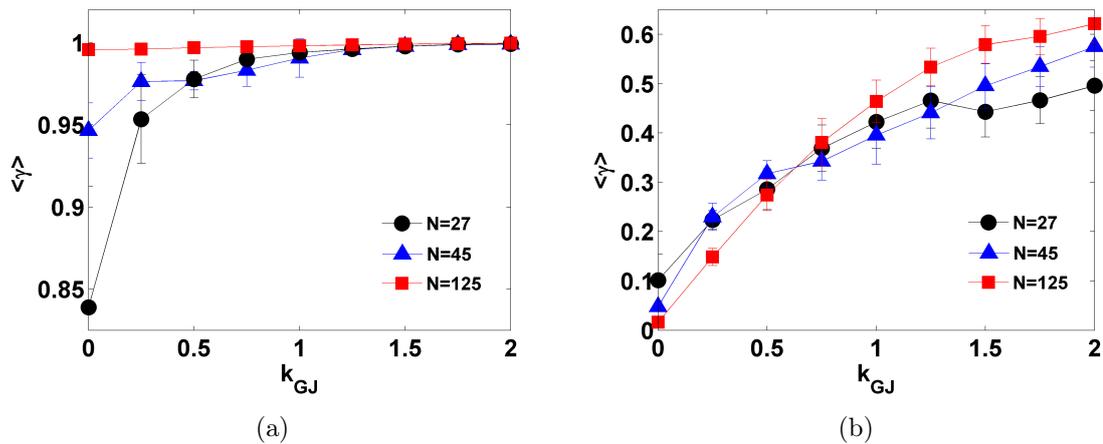


Figura 5.14: CFM do par central calculado para três tamanhos de rede: $N = 27$ (círculos), 45 (triângulos), 125 (quadrado) e $\lambda = 2,0$. (a) CFM em baixa frequência. (b) CFM em alta frequência.

compartimento central ($N = 45$ e $\lambda = 1,6$; figura 5.15) para determinar correlações com a atividade intracelular sincronizada detectada pela CFM em alta frequência (figuras 5.13(b) e 5.14(b)). O cálculo do PCE é detalhado no capítulo 3. A presença de *population spikes* é uma evidência para descargas de potências de ação sincronizadas originárias de um grupo de neurônios. Quando a interação por GJs é nula (figura 5.15(a), acima), há variações rápidas do PCE superimpostas ao decaimento da linha de base (nível DC), as quais não podem ser consideradas *population spikes*, pois suas amplitudes são menores do que 0,5 mV. O aumento da força de acoplamento alarga a duração do *burst*. *Population spikes* com amplitudes maiores do que 0,5 mV são observadas se $k_{GJ} = 2,0$. Com este valor de interação os PAs e *population spikes* disparam em sincronia (figura 5.15(b)), em acordo com os resultados das figuras 5.13(b) e 5.14(b).

Representamos as CFMs em baixa e alta frequência no espaço de parâmetros formado por k_{GJ} e λ , mais uma vez utilizando uma escala de cinzas. Essas figuras fornecem uma visão clarificada das alterações de sincronização com tais parâmetros. A CFM em baixa frequência exibe valores elevados em quase todo o espaço de parâmetros, exceto para $k_{GJ} < 0,25$ ($N = 27$ e 45). Para $N = 125$ essa tendência se altera, destacando-se duas regiões onde a CFM é superior (figura 5.16). As regiões correspondentes aos valores mais elevados da CFM em alta frequência tendem a se concentrar quando aumentamos o tamanho da rede ($N = 27$ e 45). Para $N = 27$, essa região abrange o intervalo $\lambda > 2,0$ e $k_{GJ} > 1,25$. Para $N = 45$ a região se reduz ao intervalo $2,0 < \lambda < 3,5$ e $k_{GJ} > 1,5$. Finalmente, $N = 125$ exibe um padrão diferente dos anteriores, no qual se destacam duas regiões onde a sincronização é maior no intervalo $k_{GJ} > 1,0$ (figura 5.17).

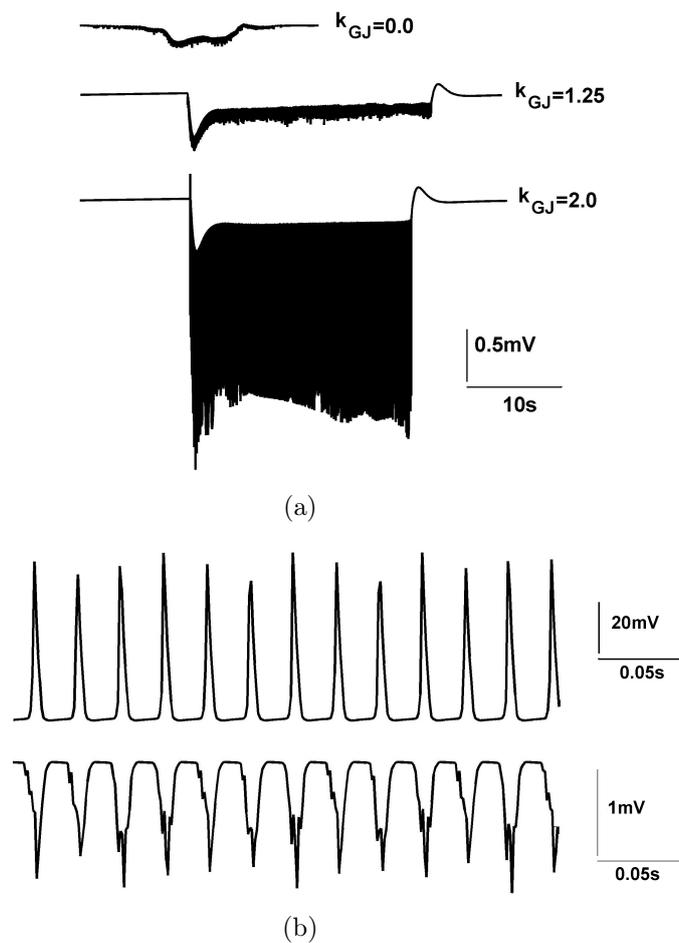
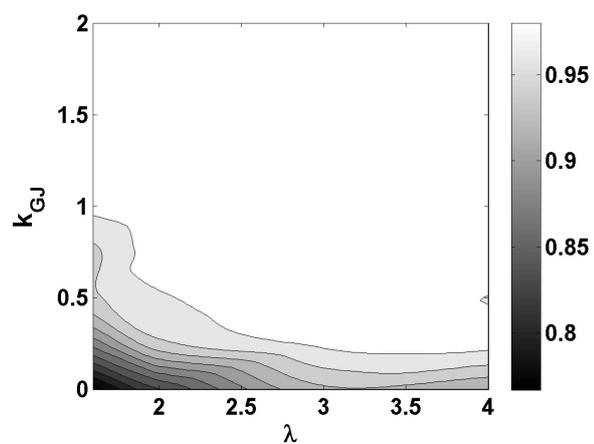


Figura 5.15: Simulação dos PCEs, medidos no compartimento central, para $N = 45$ e $\lambda = 1,6$. Em (a) de cima para baixo: $k_{GJ} = 0; 1,25; 2,0$. (b) PAs (acima) e *population spikes* (abaixo). $k_{GJ} = 2,0$.

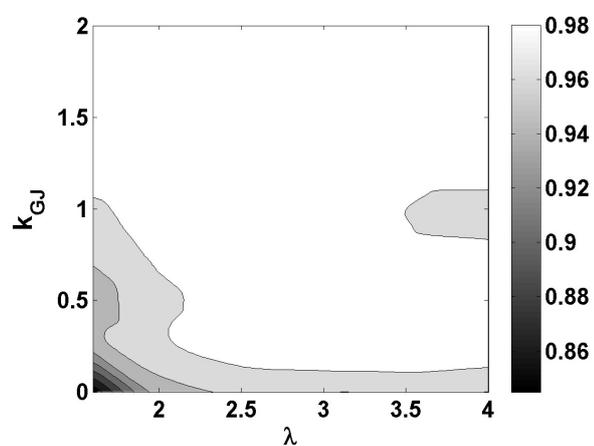
5.4 Discussão

5.4.1 O acoplamento por GJs afeta a duração de um *burst*

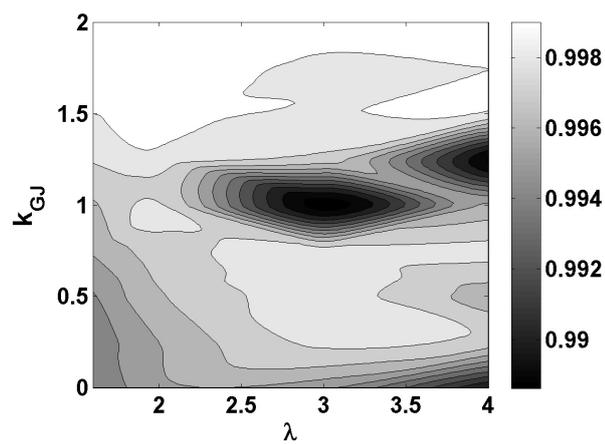
O crescimento da corrente por GJs, sob variações de tortuosidade, modula a frequência média dos *bursts* ($\langle T_{burst} \rangle$) (figuras 5.3- 5.6). Além disso, sincroniza os disparos neuronais (figuras 5.13, 5.14), recrutando, progressivamente, um número crescente de células a exibir *bursting*. Como resultado, K^+ extracelular se acumula, devido aos disparos de PAs. Tal acúmulo favorece o reforço da despolarização celular. Como consequência deste laço de despolarização positiva (Fröhlich et al., 2008a), o influxo de sódio pelos canais se intensifica, superando o efluxo devido à Na^+/K^+ -ATPase, estendendo a duração da fase ativa. A duração da fase silenciosa também cresce, pois a bomba requer um tempo maior para retornar ao nível de atividade antes do início de uma nova salva de disparos. Na figura 5.9, pontos de cruzamento entre os fluxos de sódio, os quais indicam o fim e início do período ictal, deslocam-se acompanhando o crescimento de k_{GJ} . Para k_{GJ} entre 0 e



(a)

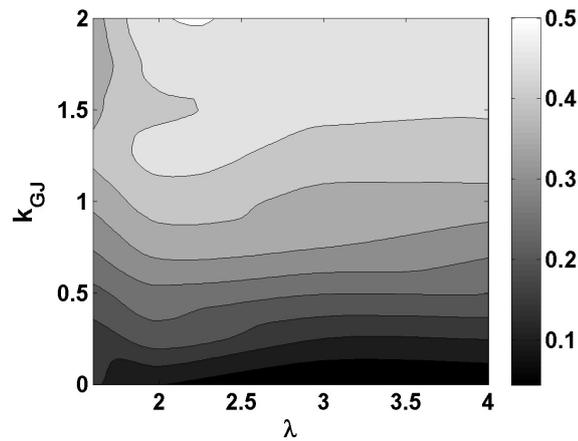


(b)

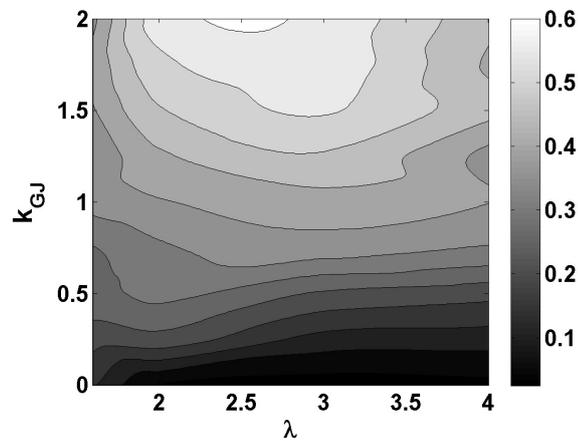


(c)

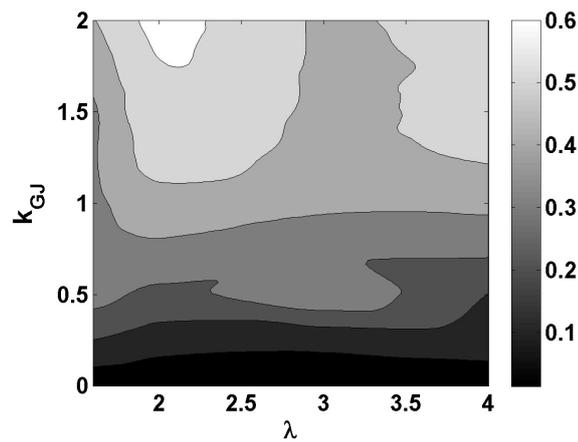
Figura 5.16: Representação da CFM em baixa frequência no espaço de parâmetros formado por k_{GJ} e λ . A CFM em baixa frequência exibe valores elevados em quase todo o espaço de parâmetros, exceto para $k_{GJ} < 0,25$ ($N = 27$ e 45). Para $N = 125$, há duas regiões onde a CFM é superior.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.17: CFM em alta frequência representada no espaço de parâmetros formado por k_{GJ} e λ . As regiões correspondentes aos valores mais elevados da CFM em alta frequência tendem a se concentrar quando aumentamos o tamanho da rede, para $N = 27$ e 45 . A figura 5.17(c), na qual $N = 125$, o padrão difere dos anteriores, destacando-se duas regiões onde a sincronização é maior no intervalo $k_{GJ} > 1,0$.

$0,1 <T_{burst}>$ decresce. O período do *burst* cresce com o aumento da interação por GJs, em concordância com estudos teóricos anteriores. Tais estudos apontam para o reforço de um mecanismo inibitório ou hiperpolarizador, o qual finaliza a fase ativa, devido à sincronização neuronal proporcionada pelas GJs. Um exemplo é o estudo de Sherman e Rinzel (Sherman e Rinzel, 1992) de um modelo simples de neurônios acoplados por GJs, os quais exibem disparos continuados de PAs ou *bursting*.

As mudanças do período do *burst* associadas à mudança de λ são provocadas pela alteração do acúmulo de K^+ extracelular no espaço intersticial. O crescimento da tortuosidade reduz a eletrodifusão, elevando $[K^+]_o$ localmente e promovendo a elevação de excitabilidade descrita anteriormente. Nas figuras 5.5(a), 5.5(c) e 5.5(e) fazendo $\lambda = 4,0$ há um crescimento importante da $[K^+]_o$, o qual produz *bursts* com duração maior. Um número maior de unidades funcionais também afeta os padrões de disparo e sincronização de modo similar a um aumento de tortuosidade (figuras 5.6(a) e 5.14(a)). Isto acontece porque um número superior de neurônios pode lançar uma quantidade maior de potássio no espaço extracelular, devido às atividades intensas, induzindo o crescimento local da $[K^+]_o$. Outro mecanismo importante, que promove a variação de $<T_{burst}>$, se relaciona ao crescimento do volume celular. A intensificação do acoplamento por GJs tende a aumentar as concentrações intracelulares de sódio e de cloreto. Esses dois íons atuam sobre as pressões osmóticas que conduzem ao inchaço celular seguida de encolhimento do espaço extracelular (Somjen, 2004). Esse fenômeno favorece o crescimento extra da $[K^+]_o$, reforçando, deste modo, o laço de despolarização positiva (Fröhlich et al., 2008a,b).

5.4.2 Modificações das frequências de disparo de potenciais de ação

O acoplamento por GJs também afeta as frequências de disparo de PAs. Nas figuras 5.5(b), 5.5(d), 5.5(f), 5.6(b) há um aumento de sincronização, que por sua vez estimula os disparos neuronais pela despolarização induzida pelo aumento da $[K^+]_o$. Além disso, observando um típico par de neurônios acoplados como na figura 5.10, o efeito sincronizador do acoplamento provoca a chegada de um estímulo despolarizador ao neurônio mais hiperpolarizado, induzindo disparos quando o acoplamento tem intensidade aumentada. Conseqüentemente, a frequência de disparo de *spikes*, na célula menos excitada, tende a crescer. Entretanto, a frequência de disparos, após atingir um ponto de máximo, decresce. Isto pode ser entendido pensando-se nos efeitos da frequência de disparos de PAs sobre a sincronização. O decaimento de $<f_{spike}>$ é, possivelmente, uma conseqüência do estabelecimento de um regime de sincronização estável, não necessariamente o regime do tipo acoplamento de fase 1:1 (capítulo 4; (Pikovsky et al., 2001), devido às propriedades celulares intrínsecas. Tal questão necessita ser investigada, também para esclarecer a importância das correntes celulares que definem o modo de disparo de PAs.

O trabalho teórico de Chow e Koppel (2000) (Chow e Koppel, 2000) fornece uma evidência para os efeitos de um regime de sincronização estável sobre frequências de disparo de PAs. Analisando diversos modelos de neurônios, que exibem disparos de PAs continuados e acoplados por sinapses elétricas, eles sugerem que frequência afeta sincronização; especificamente, que um aumento de frequência pode desestabilizar um regime de fase acoplada 1:1, dependendo das características da morfologia do PA. Encontramos o mesmo fenômeno no trabalho de Pfeuty e outros (2003) (Pfeuty et al., 2003), os quais simularam redes de neurônios conectados por GJs e investigaram a influência das correntes iônicas intrínsecas sobre os regimes de sincronização. Além desses autores, Kepler e outros (Kepler et al., 1990) também investigaram o papel das propriedades celulares, especificamente das correntes intrínsecas sobre a sincronização. Eles demonstraram que a variação de frequências causada pelo acoplamento eletrotônico é originária do balanço entre correntes de entrada e saída. Um neurônio que possua uma corrente de entrada total dominando o período de um PA acoplada a outro neurônio hiperpolarizado recebe uma corrente de saída. O resultado é um decréscimo da frequência no primeiro neurônio. Mudanças da frequência de disparos devidas ao acoplamento por GJs também foram reportadas nos trabalhos experimentais de Perez-Velazquez e outros (Perez-Velazquez et al., 2001) e Galarreta e Hestrin (Galarreta e Hestrin, 1999), nos quais a dependência de características celulares é destacada.

Nas figuras 5.5(b), 5.5(d), 5.5(f) e 5.6(b), alterações da tortuosidade e do tamanho da rede deslocam o ponto de máximo de $\langle f_{spike} \rangle$, também alterando o seu intervalo de variação (menor quando λ ou N são maiores). Outro mecanismo que pode reduzir a frequência de *spikes* é o bloqueio por despolarização (Bikson et al., 2003), devido ao excesso de $[K^+]_o$, o qual diminui o número de PAs por *burst*. Tal mecanismo aparece quando despolarizações muito intensas inativam os canais para sódio dependentes de voltagem. Deste modo, a célula se torna inexcitável, pois o limiar para disparo de PAs cresce (Somjen, 2004). O bloqueio por despolarização pode ser visto nas figuras 5.4(b) e 5.4(c), nas quais os PTs simulados para $\lambda = 4,0$ e $k_{GJ} = 2,0$ mostram amplitudes reduzidas em mais de 96% no início do *burst*.

5.4.3 Sincronização

Diversos trabalhos relatam sincronização devido ao acoplamento eletrotônico (Galarreta e Hestrin, 1999; Kepler et al., 1990; Perez-Velazquez e Carlen, 2000; Perez-Velazquez et al., 2001, 1994; Sherman e Rinzel, 1991, 1992). O presente estudo corrobora esses resultados, pois há sincronização entre PAs e *bursts* simulados devida à interação por GJs (figuras 5.13, 5.14). Os PCEs exibem *population spikes* e há atividade em compasso entre disparos no intra e extracelular (figura 5.15), reflexo das descargas de PAs da população em um mesmo ritmo. Todavia, já que investigações anteriores não modelam a corrente por

GJs sob intensa variação das CIs, eles podem não oferecer explicações precisas sobre como alterações, por exemplo, da $[K^+]_o$, afetam a sincronização. A CFM em baixa frequência (figuras 5.13(a), 5.13(b) e 5.14(a)) indica sincronização quando o acoplamento é nulo, mais intenso no par central, para tortuosidades e tamanhos de rede maiores. Nesta situação, o acúmulo de potássio intersticial se intensifica. Além disso, $[K^+]_o$ elevadas tendem a homogeneizar a atividade neuronal, reduzindo as diferenças em tempo de disparo e amplitude. Podemos compreender isto pensando na arquitetura da rede do modelo, na qual cada estrutura celular se encontra imersa em uma região de espaço extracelular em uma dada unidade funcional. Igualar as concentrações nessas regiões tende a tornar as descargas celulares semelhantes. Por outro lado, a proximidade da solução de perfusão tem efeito dessincronizador, porque remove K^+ extracelular favorecendo a heterogeneidade neuronal. Entretanto, alta $[K^+]_o$ parece ter menor importância para a sincronização entre *spikes*, pois há diferenças mínimas entre a CFM em alta frequência com o incremento de λ , com a modificação da posição do par (figuras 5.13(c) e 5.13(d)) e também alterando-se N (figura 5.14(b)).

Capítulo 6

Concentrações iônicas extracelulares

No modelo AENS, a remoção do acoplamento por GJs torna possível investigar os efeitos isolados da variação das CIs extracelulares, especialmente $[K^+]_o$ sobre padrões de disparo e sincronização. Tal variação é ajustada pela tortuosidade, que altera a eletrodifusão no meio extracelular, ou pelo tamanho da rede de compartimentos, a qual modifica a quantidade de potássio lançada ao extracelular devido às atividades neuronais. Analisamos valores da tortuosidade fisiológica do ME no intervalo $1,4 \leq \lambda \leq 2,4$ ((Hrabítoová e Nicholson, 2007; Syková, 2004; Syková e Nicholson, 2008)) e incluímos o intervalo $2,4 < \lambda \leq 4,0$ para analisar uma redução entre 83% e 99% do coeficiente de difusão livre. Mantivemos os tamanhos de rede investigados no capítulo anterior ($N = 27, 45$ e 125). Além disso, reduzimos o intervalo de variação da componente aleatória das variáveis de inicialização das CIs e do potencial de repouso para $\pm 5\%$ (capítulo 5). Isto evita o disparo de seqüências ininterruptas de potenciais de ação, em detrimento do *bursting*. As variações aleatórias das permeabilidades máximas de canais iônicos e do íon A^+ originário do trabalho líquido da Na^+/K^+ -ATPase permanecem com o intervalo igual a $\pm 5\%$.

6.1 Padrões de disparo

Na ausência do acoplamento por GJs, a modificação da eletrodifusão modulada pela tortuosidade altera frequências e amplitudes de *bursts* e PAs. Na figura 6.1, PTs simulados para os três tamanhos de rede e $\lambda = 1,6; 2,4; 4,0$ trazem uma variação do período completo do *burst*. Há um aumento da duração da fase ativa com a elevação da tortuosidade, exceto se $N = 125$. As amplitudes dos PAs tendem a se reduzir com λ crescente especialmente no início da fase ativa do *burst*. Tal fenômeno é similar ao descrito no capítulo 5. Note que a redução é maior se $\lambda = 4,0$; particularmente, se $N = 125$ há interrupção do disparo de PAs (veja o detalhamento da figura 6.1(d)), uma evidência de bloqueio por despolarização (Bikson et al., 2003).

Utilizamos os métodos descritos no capítulo 5 para calcular o período médio do *burst*

sobre oito amostras de configurações aleatórias, o que define a variável $\langle T_{burst} \rangle$. Fizemos o mesmo para calcular a frequência média de disparos de PAs, $\langle f_{spike} \rangle$. A figura 6.2 traz os gráficos dessas grandezas em função da tortuosidade para $N = 27, 45$ e 125 . Escolhemos o neurônio central e dois outros situados na fronteira com os planos de perfusão e com a interface gás-líquido, escolhidos aleatoriamente. Os gráficos mostram o crescimento monotônico de períodos e frequências quando se diminui a eletrodifusão, em todo o intervalo de tortuosidade, com exceção do neurônio central (figuras 6.2(a) e 6.2(b)). Neste caso, para $N = 125$ e $\lambda > 3,0$, há um decréscimo de $\langle T_{burst} \rangle$ (que corresponde ao comportamento do PT da figura 6.1(c)). Também $\langle f_{spike} \rangle$ decai se $\lambda > 2,4$. O intervalo de crescimento de $\langle T_{burst} \rangle$ e $\langle f_{spike} \rangle$, no neurônio central, corresponde à faixa de valores medidos, ou fisiológicos, da tortuosidade (Syková e Nicholson, 2008).

Para observar os efeitos da variação de tortuosidade sobre tal dinâmica, fizemos o gráfico das densidades de fluxo de sódio via canais iônicos e via Na^+/K^+ -ATPase do neurônio central, seguindo os procedimentos do capítulo 5, seção 5.2.1 (figura 6.3). Cada par de curvas, com uma mesma cor, foi simulada usando um dos seguintes valores de tortuosidade $\lambda = 1,5; 1,6; 2,0; 3,0$ e $4,0$. Os pontos de cruzamento, marcados por círculos, indicam a transição para um período silencioso e são unidos pela linha de tendência em vermelho. Observe o crescimento monotônico da duração da fase ativa com o aumento de tortuosidade nas figuras 6.3(a) e 6.3(b). As amplitudes máximas das densidades de fluxo da bomba- Na^+/K^+ tendem a crescer, exceto quando $N = 125$, onde há uma redução se $\lambda > 2,0$. As amplitudes máximas das densidades pelos canais decrescem com λ para $N = 45$ e 125 . Neste último caso, a redução é significativa para $\lambda > 2,0$.

No capítulo anterior, vimos que o acúmulo de potássio extracelular é determinante para a modulação da frequência média dos *bursts*. Este comportamento persiste quando anulamos a interação por GJs. A figura 6.4 traz cinco períodos das variações temporais de $[\text{K}^+]_o$ no neurônio central, para os três tamanhos de rede e valores de tortuosidade. Mais uma vez utilizamos um filtro passa-baixa para remover as oscilações rápidas, as quais prejudicariam a visualização. Também deslocamos as trajetórias para terem início no mesmo instante de tempo, permitindo melhor comparação entre períodos e amplitudes. O aumento de N tende a alargar os ciclos, além de aumentar as amplitudes máximas, as quais variam entre 11 e 14,5 mM ($\lambda = 1,6$), entre 13 e 15,5 mM ($\lambda = 2,0$) e entre 16 e 21 mM ($\lambda = 4,0$). Entretanto, para $\lambda = 4,0$ e $N = 125$, o período é menor do que para os demais valores de N e, durante a fase ativa as oscilações se tornam mais rápidas (figura 6.4(c)).

Em resumo, a interação mediada pelas alterações das CIs extracelulares modifica os padrões de disparo do *bursting*, ou seja suas amplitudes e frequências. Para melhor visualização dessas modificações, recorreremos à representação das variações de $\langle T_{burst} \rangle$ e $\langle f_{spike} \rangle$ no espaço de parâmetros formado por λ e N . Na figura 6.5(a) observamos o crescimento do período médio do *burst* quando aumentamos a tortuosidade. A frequência

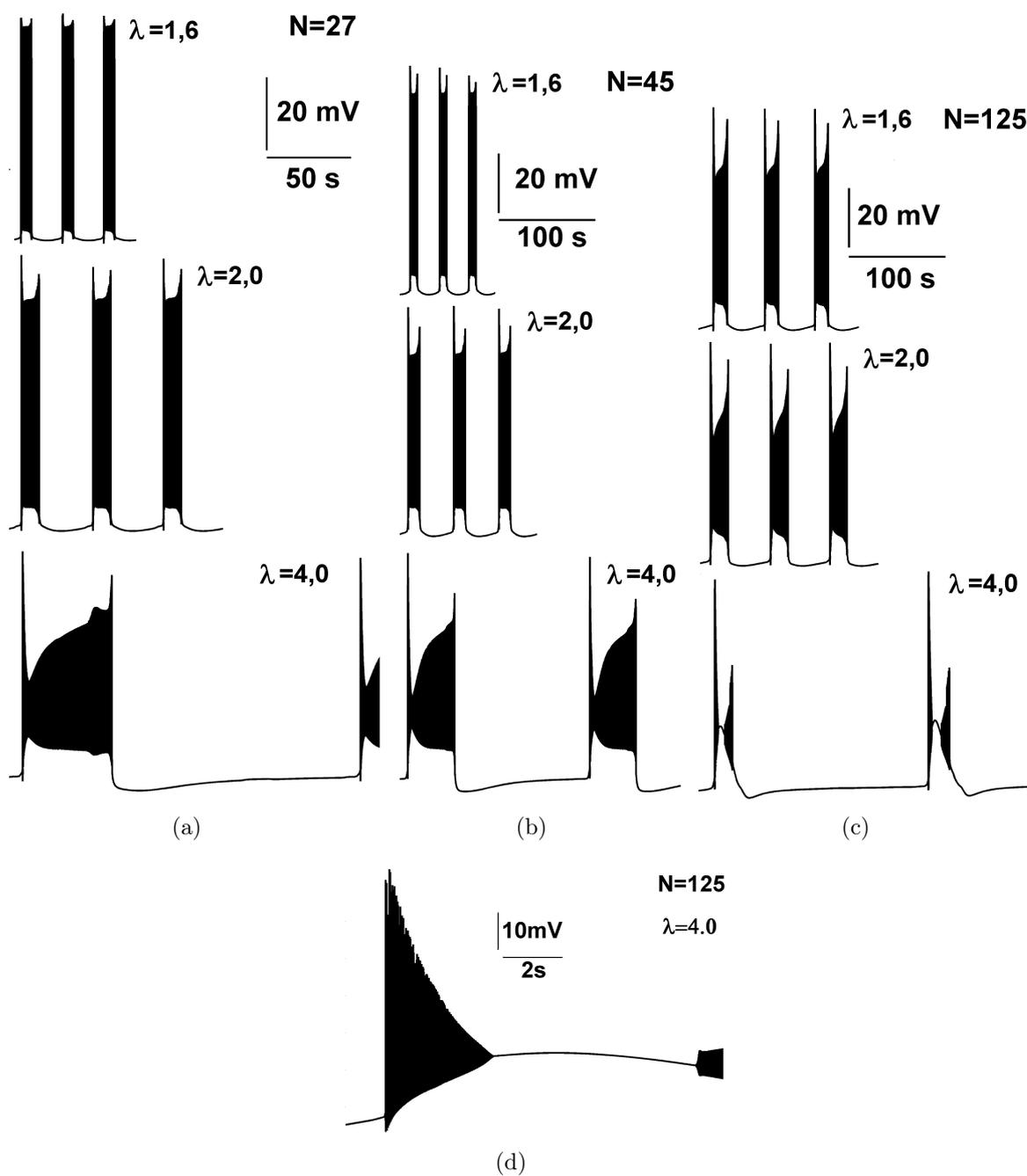


Figura 6.1: PTs de neurônios típicos modificados pela tortuosidade e tamanho da rede (um ciclo completo). $\lambda = 1,6; 2,0$ e $4,0$ e $N = 27$ (a), 45 (b) e 125 (c), (d). Em (d), no detalhamento do início da fase ativa do terceiro *burst* de (c) – da esquerda para a direita – observamos a interrupção do disparo de PAs.

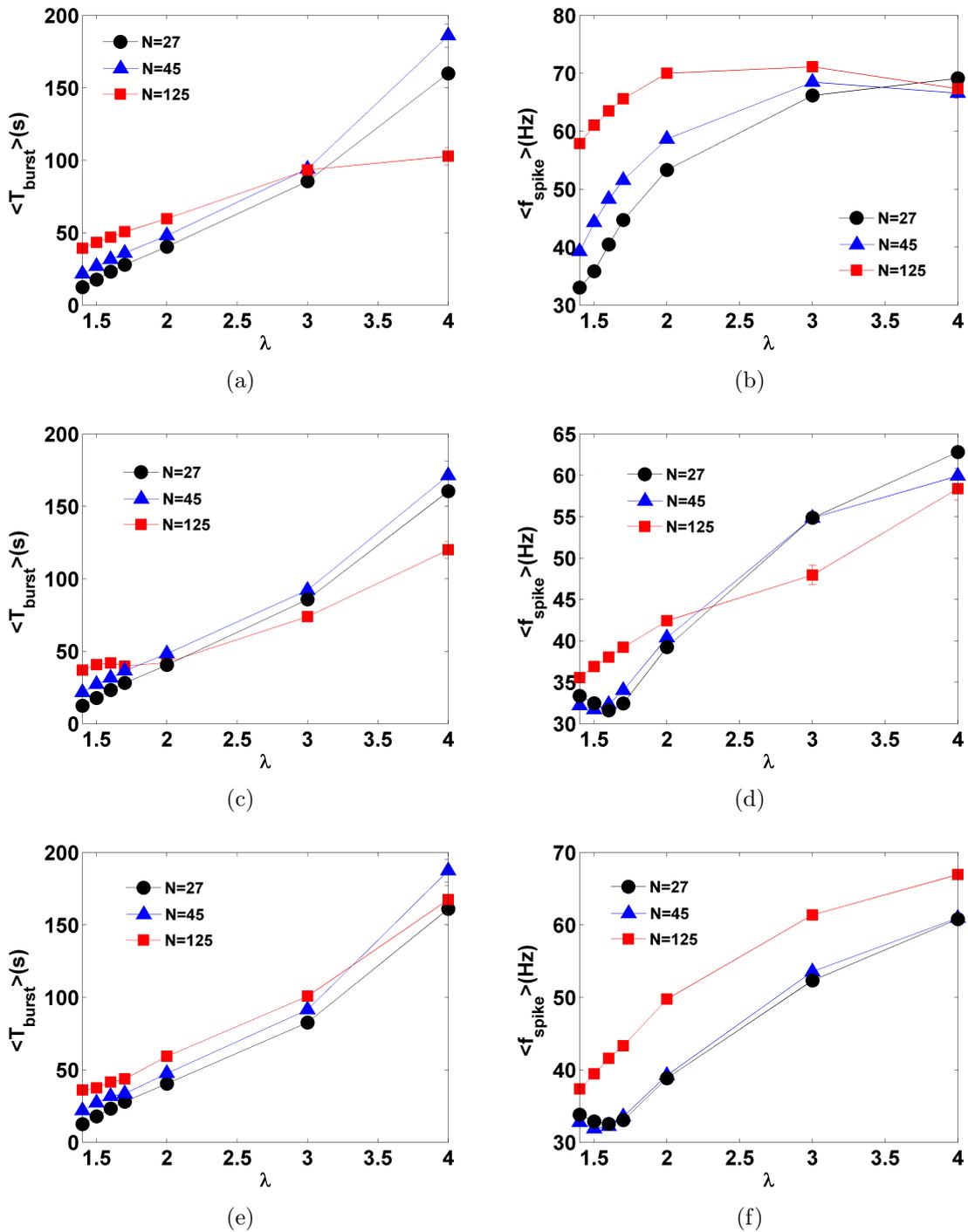
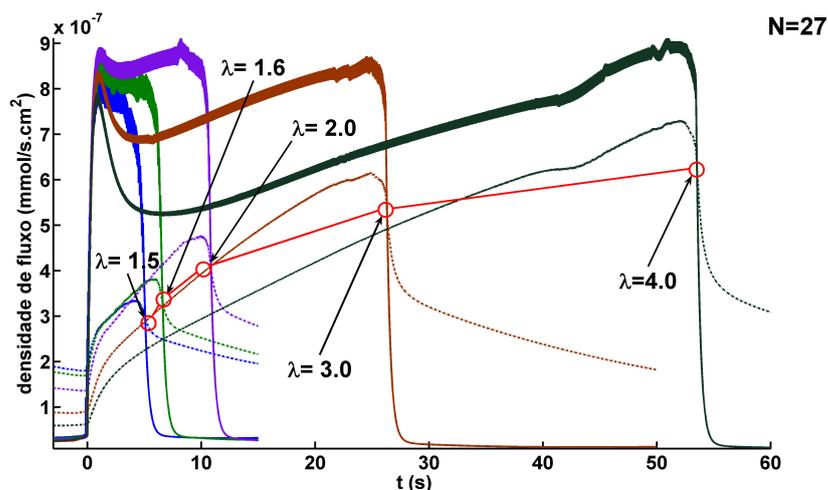
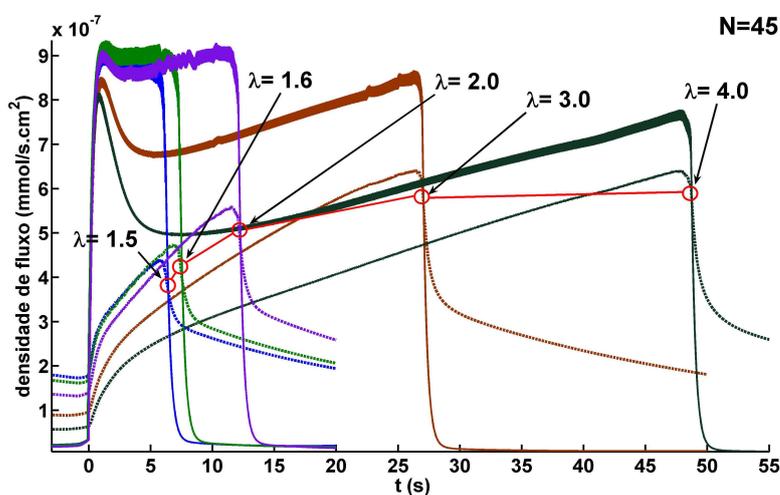


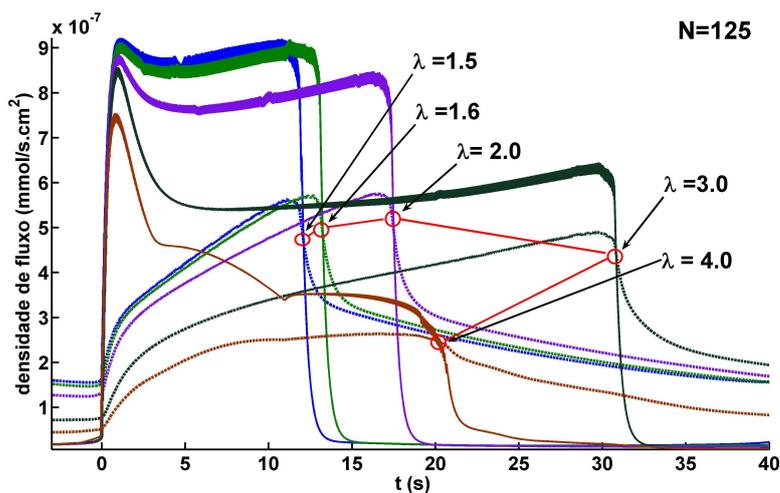
Figura 6.2: $\langle T_{burst} \rangle$ e $\langle f_{spike} \rangle$ variam com N e λ . Escolhemos três neurônios, o primeiro no centro (a), (b) e os demais em localizações aleatórias próximas aos planos de fronteira com a perfusão (c), (d) e com a interface gás-líquido (e),(f). $N = 27$ (círculos), $N = 45$ (triângulos), $N = 125$ (quadrados). As curvas apontam crescimento monotônico de $\langle T_{burst} \rangle$ e $\langle f_{spike} \rangle$, exceto no centro da rede, onde há um decaimento para $\lambda > 3,0$ e $N = 125$ em $\langle T_{burst} \rangle$ e $\lambda > 2,4$ em $\langle f_{spike} \rangle$. As grandezas são expressas como $\langle \text{média} \rangle \pm$ erro padrão. As barras de erro são menores do que os símbolos.



(a)

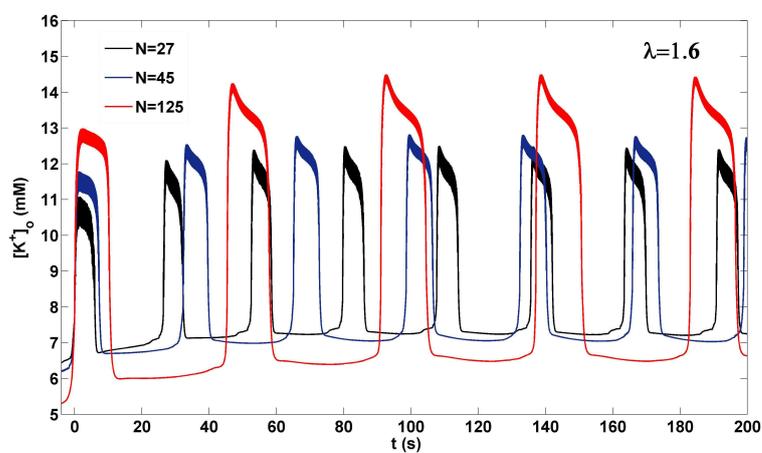


(b)

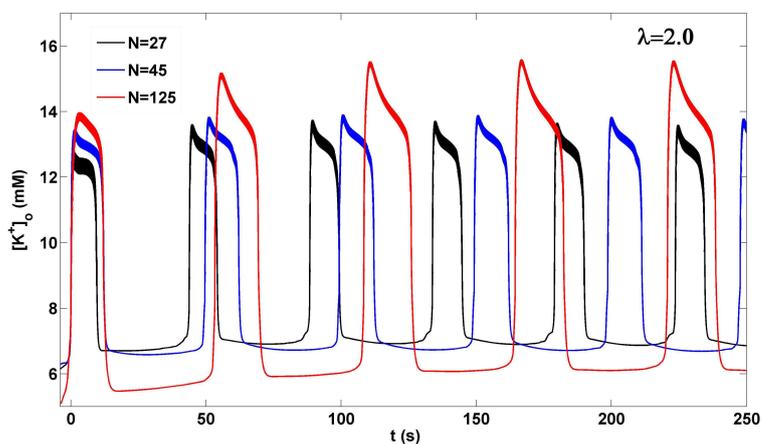


(c)

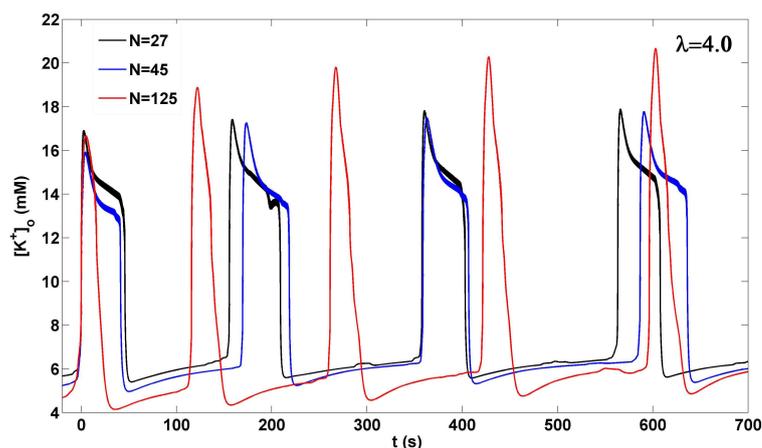
Figura 6.3: Cruzamento das densidades de fluxo de sódio via canais iônicos (linhas cheias) e Na^+/K^+ -ATPase (linhas tracejadas) no neurônio central. $N = 27$ (a), 45 (b), 125 (c). Os pares de curvas, com a mesma cor, correspondem aos valores de $\lambda = 1,5; 1,6; 2,0; 3,0$ e $4,0$. Os pontos de cruzamento (círculos vermelhos) são unidos por uma linha de tendência (em vermelho).



(a)



(b)



(c)

Figura 6.4: Concentrações extracelulares de potássio do neurônio central em função do tempo para $N = 27$ (preto), 45 (azul), 125 (vermelho). $\lambda = 1,6$ (a), 2,0 (b) e 4,0 (c).

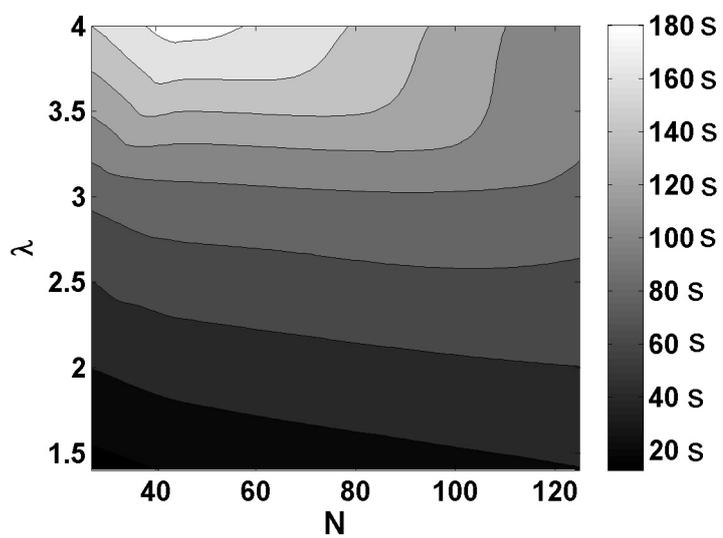
média dos PAs tende a crescer quando elevamos a tortuosidade e o total de unidades funcionais conjuntamente. A região onde $\langle f_{spike} \rangle$ é máxima pertence ao intervalo $2,0 < \lambda < 3,5$ e $N > 70$ (figura 6.5(b)).

6.2 Sincronização

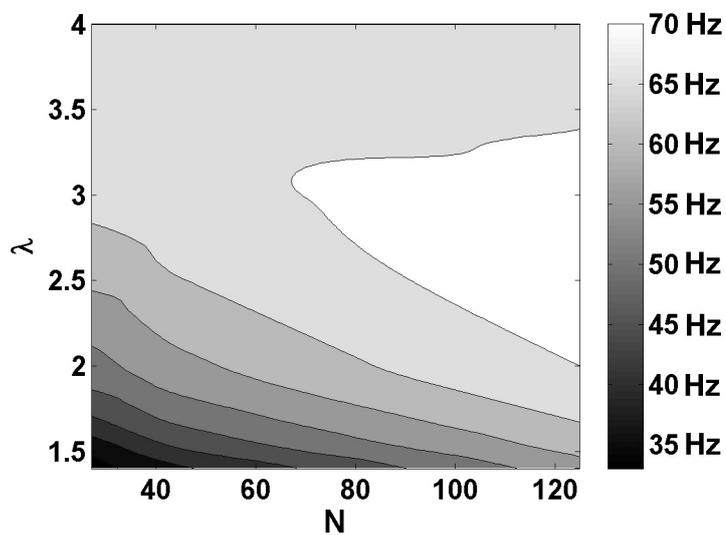
Caracterizamos a sincronização entre PTs utilizando os procedimentos descritos no capítulo 5 (filtragem dos PTs e descarte de 10% das fases no início e fim dessas series temporais). Utilizamos, como frequências de corte, os valores 1 Hz (para *bursts*) e 52 ± 2 Hz (para PAs), pois observamos tais frequências nos espectros de potências obtidos para todas as tortuosidades e tamanhos de rede simulados (figura 6.6). Obtivemos a CFM em alta e baixa frequência em função da tortuosidade e para $N = 27, 45$ e 125 unidades funcionais. Mais uma vez, para verificar diferenças com relação à localização na rede, selecionamos pares de neurônios no centro e nas fronteiras (figura 6.7). Os valores da CFM em baixa frequência são superiores a 0,85 para todos os N s (figuras 6.7(a) e 6.7(c)). O par no centro da rede apresenta sincronizações superiores às do par na fronteira. As curvas também apontam para o crescimento da sincronização no intervalo $\lambda < 2,0$, com decaimento pronunciado no par da fronteira. A queda de sincronização no par central é maior para $N = 125$ (e $\lambda > 2,0$). Note que o crescimento da CFM acontece em um intervalo de tortuosidade igual a $1,4 \leq \lambda < 2,4$, equivalente ao que consta da literatura como intervalo fisiológico (Syková e Nicholson, 2008). A CFM em alta frequência (figuras 6.7(b) e 6.7(d)) apresenta-se com valores inferiores a 0,20 em todos os pares, indicando baixa sincronização entre PAs. Dessas curvas não se pode inferir um padrão regular de variação da CFM com o tamanho da rede. No par central observamos uma tendência de crescimento da CFM com a tortuosidade, contrariamente às curvas da CFM do par da fronteira, as quais decaem com o aumento de λ .

Tal evidência de que o acúmulo de potássio extracelular é insuficiente para sincronizar efetivamente PAs é corroborada pelas figuras 6.8 e 6.9. Na figura 6.8, ilustramos a evolução temporal de um par de neurônios primeiros vizinhos, escolhido aleatoriamente, da rede $N = 125$, sendo $\lambda = 1,6; 2,0$ e $4,0$. O neurônio mais despolarizado (em preto nas figuras 6.8(a) e 6.8(b)) não induz despolarizações no seu vizinho para qualquer valor de N . Os tempos de disparos não se mostram em compasso e também não podemos inferir mudanças na frequência de disparos. Além disso, na figura 6.9, os PCEs (medidos no compartimento central da rede) não exibem *population spikes* e, portanto, não há indicação de disparo síncrono de PAs da população de neurônios.

No espaço de parâmetros, formado por λ e N , a CFM em baixa frequência se mostra elevada em quase toda a região, ao contrário da CFM em alta frequência, que exhibe valores abaixo de 10% também em quase toda a região (figura 6.10). Isto indica que as variações das CIs extracelulares pouco alteram os padrões de sincronização, seja não modificando os



(a)



(b)

Figura 6.5: Representação de $\langle T_{burst} \rangle$ (6.5(a)) e $\langle f_{spike} \rangle$ (6.5(b)) no espaço de parâmetros formado por λ e N .

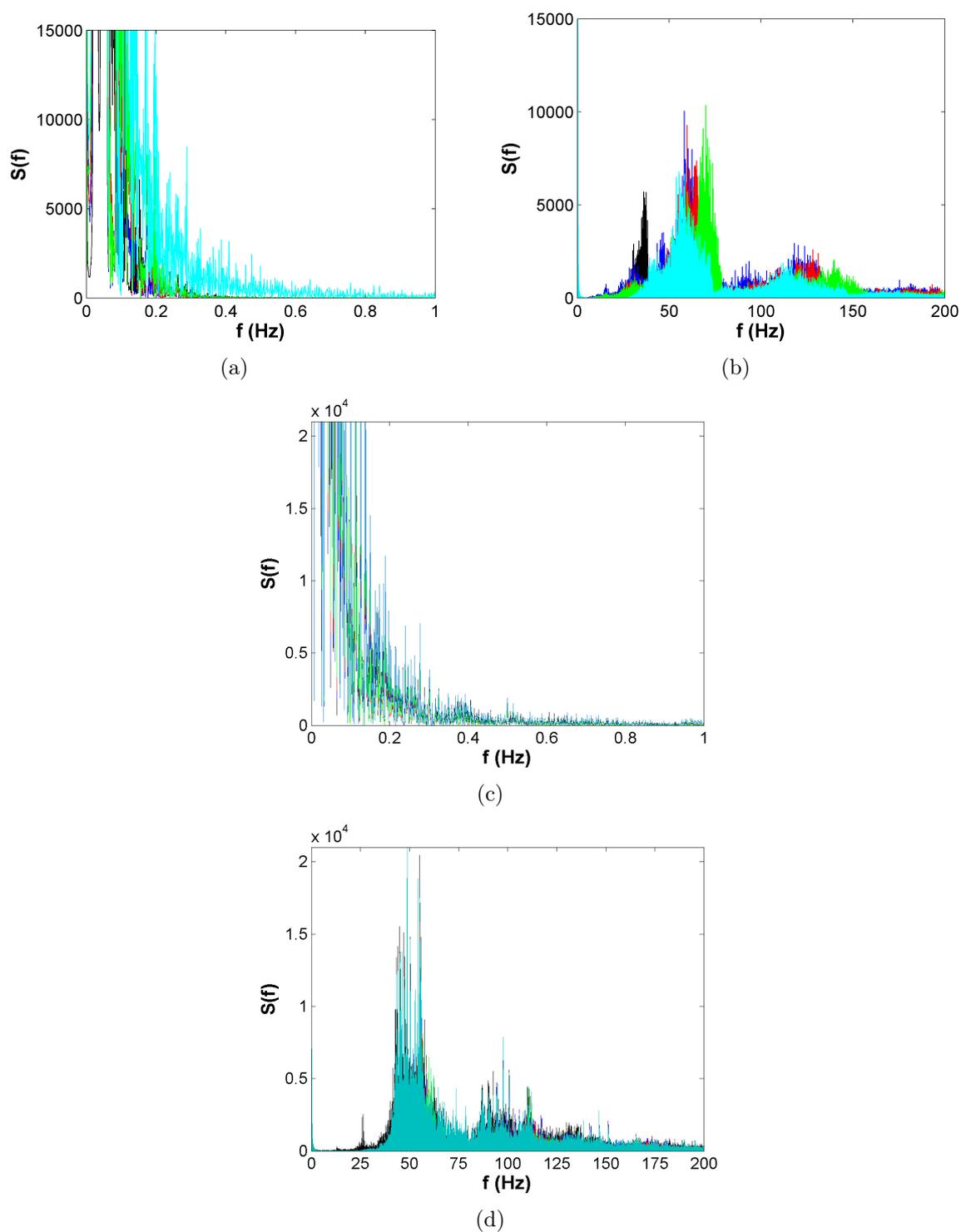


Figura 6.6: Espectro de potências dos PTs simulados para $N = 125$ e $\lambda = 1,6$. Em (a),(b) $k_{GJ} = 0$ e em (c), (d) $k_{GJ} = 2,0$. Esses padrões são semelhantes quando mudamos todos os demais parâmetros.

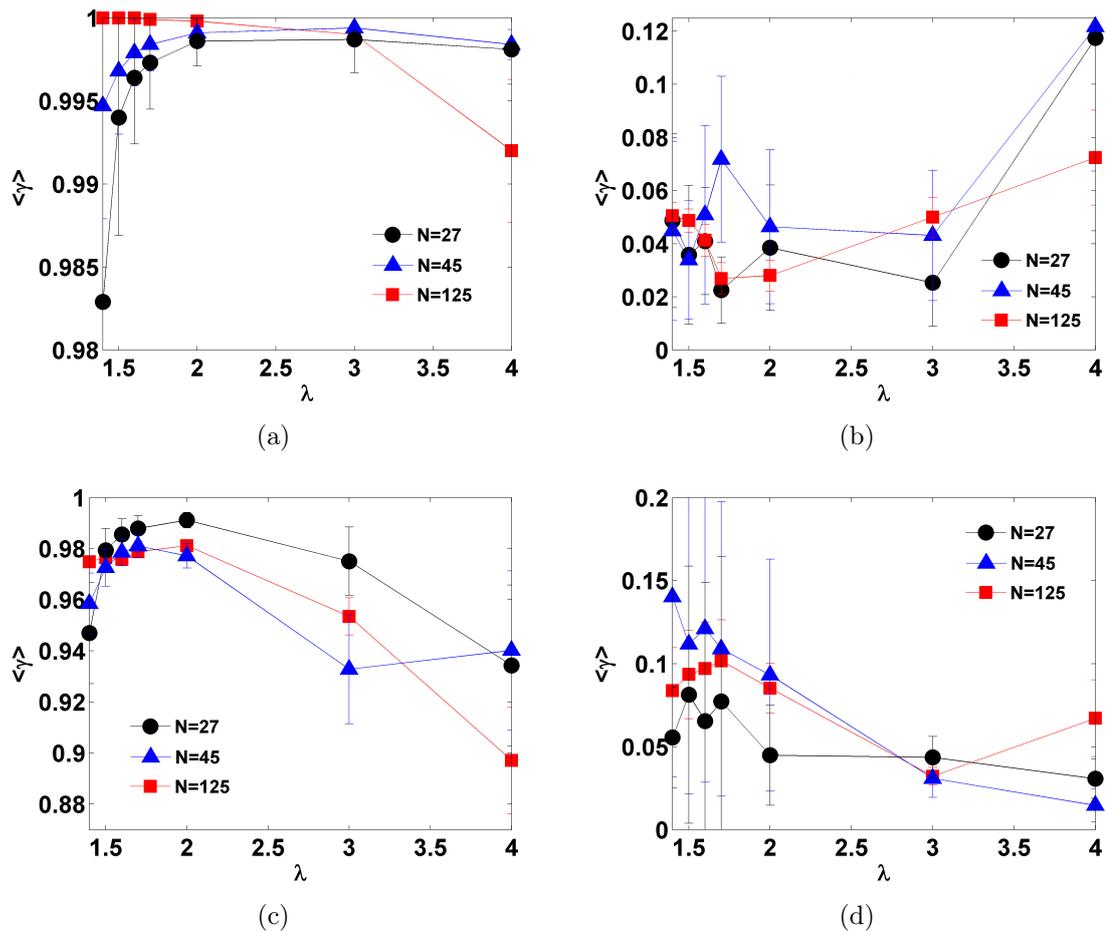


Figura 6.7: CFM versus λ para três tamanhos de rede: $N = 27$ (círculos), 45 (triângulos) e 125 (quadrados). Os gráficos (a) e (b) correspondem a um par situado no centro da rede; (c) e (d) representam um par próximo a um plano de fronteira. A CFM em baixa frequência acusa valores acima de 90% em (a) e (c), mas há uma tendência de queda para $\lambda > 2,0$. A CFM em alta frequência indica sincronização baixa entre PAs e crescimento da sincronização com a tortuosidade no par central.

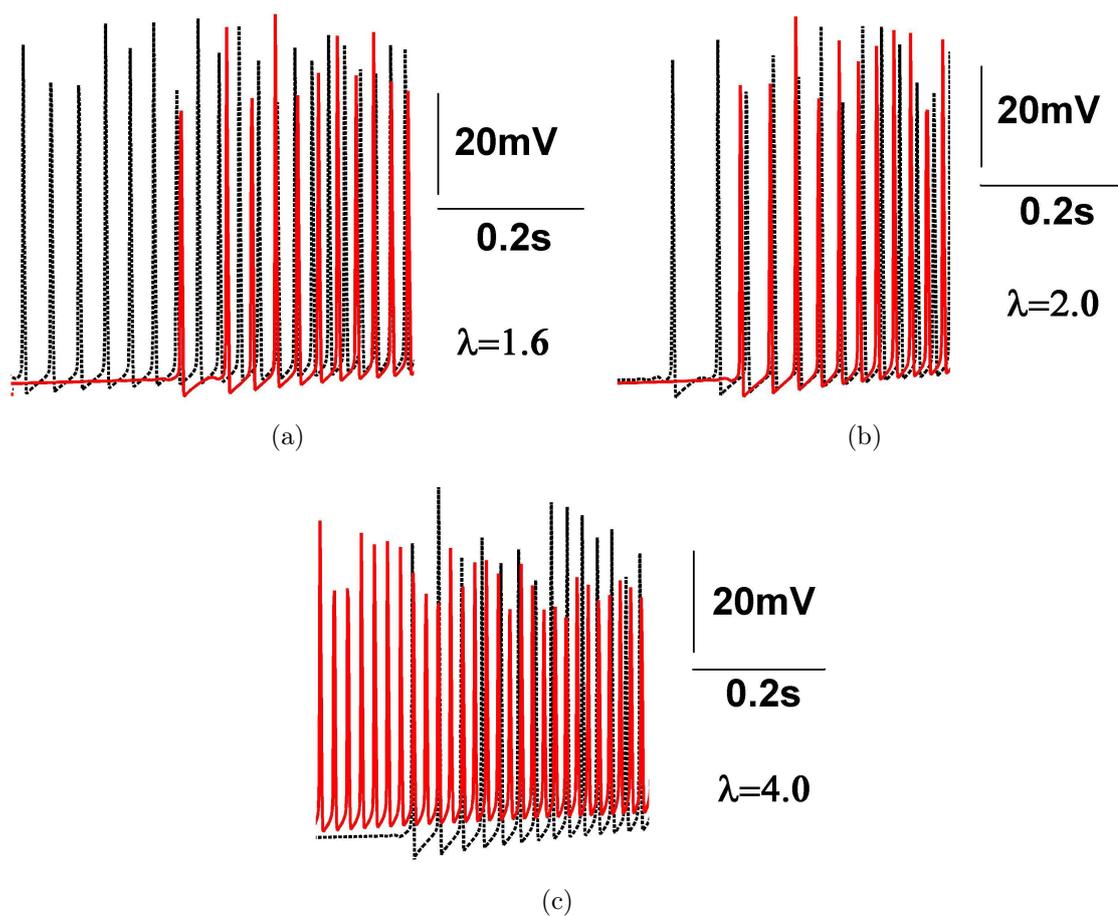


Figura 6.8: Potenciais de ação no início da fase ativa do *burst* de um par acoplado localizado no centro da rede ($N = 125$) para $\lambda = 1,6$ (a); $2,0$ (b) e $4,0$ (c). O aumento da tortuosidade, sem a presença de acoplamento eletrotônico não é suficiente para induzir despolarizações de baixa amplitude no neurônio mais hiperpolarizado ((a) e (b) em vermelho e preto em (c)); além disso, não há sincronização de PAs (veja figura 5.10,página 77).

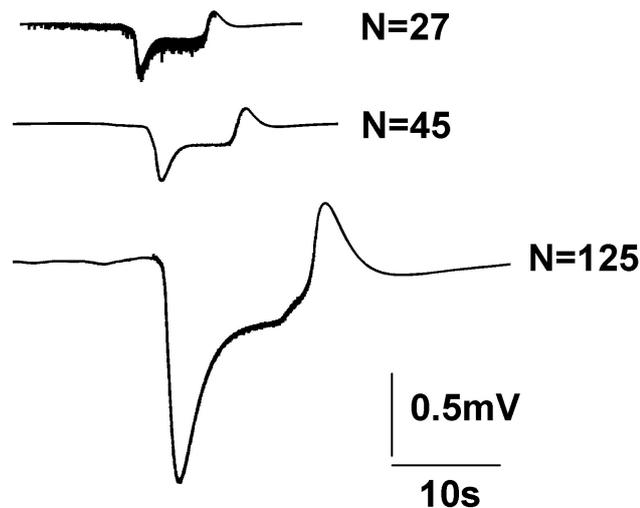


Figura 6.9: Simulação dos potenciais de campo extracelulares, medidos no compartimento central, para $\lambda = 1,6$ e $N = 27$ (acima), 45 (meio), 125 (abaixo).

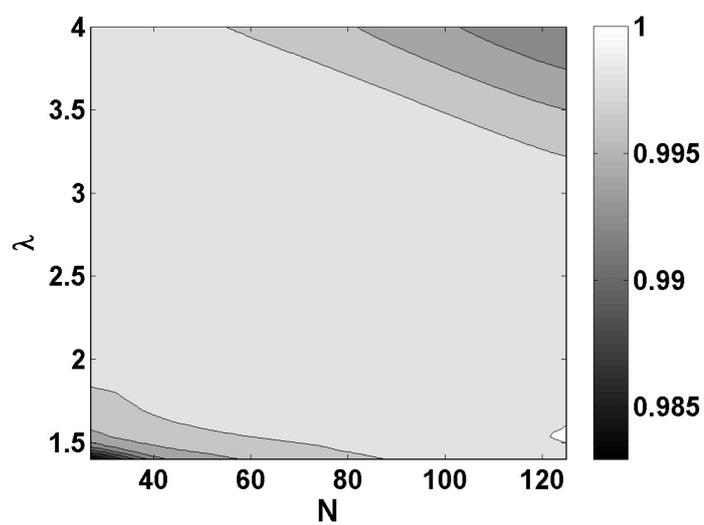
valores elevados (acima de 90%) da CFM em baixa frequência ou as baixas sincronizações entre os PAs.

6.3 Discussão

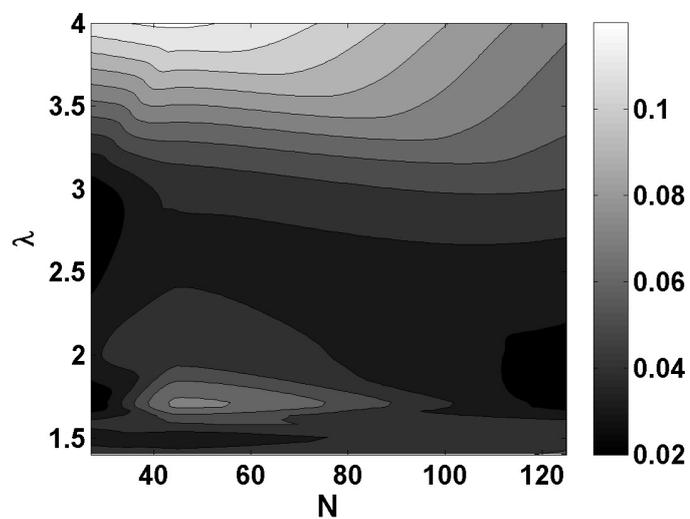
6.3.1 Acúmulo de potássio extracelular influencia padrões de disparo

A variação da tortuosidade e do número de unidades funcionais altera as concentrações de todos os íons incorporados ao modelo: Na^+ , Cl^- e K^+ . No entanto, a modificação de $[\text{K}^+]_o$ a qual controla diretamente a excitabilidade neuronal e atua sobre as concentrações intracelulares dos demais íons, é determinante para alterar os padrões de disparo. Um aumento de tortuosidade, reduzindo a eletrodifusão e elevando o acúmulo de K^+ o nas vizinhanças de um dado neurônio, tende a aumentar $\langle T_{burst} \rangle$ (figuras 6.1, 6.2(a), 6.2(c) e 6.2(e)). Todavia, no centro da rede, um crescimento superior de $[\text{K}^+]_o$ causado pelo aumento de N (figura 6.2(a)) reduz o período médio do *burst* no intervalo $\lambda > 3,0$. $\langle f_{spike} \rangle$ (figuras 6.2(b), 6.2(d) e 6.2(f)) apresenta dinâmica similar: cresce com a tortuosidade e se reduz se $N > 27$ e $\lambda > 3,0$ no centro da rede.

No capítulo 5, o aumento de N eleva a quantidade de K^+ lançada ao ME devido aos disparos em um número maior de neurônios. Isto leva à situação da figura 6.4(c), na qual há picos de $[\text{K}^+]_o$ em torno de 21 mM no centro da rede $N = 125$ e $\lambda = 4,0$ (lembrando que $[\text{K}^+]_o$ valia 8 mM no início da simulação). O acúmulo excessivo de K^+ o pode levar ao bloqueio por despolarização (Bikson et al., 2003; Cressman Jr. et al., 2009; Kager et al., 2007; Somjen, 2004) responsável por reduzir a excitabilidade, levando à interrupção



(a)



(b)

Figura 6.10: CFM em baixa (6.10(a)) e em alta frequência (6.10(b)) no espaço de parâmetros formado por λ e N .

do disparo de PAs. Por sua vez, isto leva à diminuição de $\langle T_{burst} \rangle$ e de $\langle f_{spike} \rangle$, pois um neurônio menos excitável tenderá a disparar um número menor de *spikes* durante a fase ativa. As diferenças de $\langle T_{burst} \rangle$ e $\langle f_{spike} \rangle$ com a posição na rede se devem à proximidade da solução de perfusão, a qual funciona como mecanismo de remoção de íons das vizinhanças de um neurônio. No centro da rede, onde tal proximidade é menor, o acúmulo de potássio é facilitado e neste ponto o bloqueio por despolarização tende a ser mais intenso. Note que, neste caso, o impedimento à excitabilidade leva ao influxo menor de sódio pelos canais iônicos (figura 6.3(c)). Ainda nesta figura, a redução da excitabilidade leva a uma redução do período de $[K^+]_o$.

6.3.2 Sincronização

O acúmulo de K_o^+ também altera padrões de sincronização, especialmente a sincronização entre *bursts*. A CFM em baixa frequência apresenta valores acima de 0,85 e cresce no intervalo $\lambda < 2.0$ para todos os Ns estudados (figuras 6.7(a) e 6.7(c)). Deste modo, o aumento de $[K^+]_o$ causado pela redução da eletrodifusão pode sincronizar *bursts*, sendo esse efeito maior no centro da rede, se $\lambda < 2.0$ (figura 6.7(a)). No entanto, o acúmulo mais intenso de K_o^+ , devido a um aumento de tortuosidade ou do número de unidades funcionais, reduz a CFM. Além disso, no par da fronteira, o decréscimo da CFM em baixa frequência para $\lambda > 2.0$ é mais evidente. Esses fenômenos se associam: 1) desacoplamento provocado pelo impedimento severo à eletrodifusão; 2) proximidade da solução de perfusão que aumenta diferenças entre tempos de disparo e amplitudes.

Outro efeito do desacoplamento pelo crescimento de λ , que reduz a sincronização, é atenuar a excitabilidade e reduzir $\langle T_{burst} \rangle$ e $\langle f_{spike} \rangle$, pelo decréscimo da taxa de aumento de $[K^+]_o$, abaixo do limiar para bloqueio por despolarização. A CFM em alta frequência traz valores inferiores a 0,20, indicando baixa sincronização entre PAs (também confirmada pelos resultados das figuras 6.8 e 6.9). Acoplamentos pela eletrodifusão acontecem numa escala de tempo (segundos) três ordens de grandeza superior à de um PA. Deste modo, os valores não nulos, mas baixos, da CFM devem ser provocados pela homogeneização dos disparos neuronais (devida ao acúmulo de K_o^+). Note a tendência ao aumento da CFM em alta frequência no par do centro da rede (figura 6.7(b)).

Alguns autores investigaram o efeito do potássio extracelular sobre sincronização e disparos, sem a presença das demais interações celulares. Park e outros (Park et al., 2008) trabalharam na hipótese de que a difusão de K_o^+ modifica sincronização e padrões de disparos. No seu estudo computacional, uma rede bi-dimensional de neurônios piramidais do CA1 é acoplada apenas pela difusão de K^+ pelo ME. Eles observaram que o acoplamento estabelece o padrão periódico de disparos e que um decréscimo em sincronização se associa ao impedimento da difusão. Além desses autores, Stokes e Rinzel (Stokes e Rinzel, 1993) estudaram um modelo para *bursting* em células β do pâncreas, incorporando uma

estrutura tridimensional com difusão de K^+ como mecanismo acoplador, sem a presença de sinapses elétricas ou químicas. Eles mostraram que a difusão de K^+ pode sincronizar *bursts* numa relação temporal do tipo 1:1.

Capítulo 7

Conclusões e Perspectivas

Nesta tese investigamos a influência de acoplamentos não-sinápticos sobre os padrões de disparo e sincronização de *bursts* epileptiformes. Utilizamos um modelo computacional que simula AENS *in vitro* na camada granular do GD do hipocampo de ratos. Exploramos os efeitos da variação das CIs extracelulares, principalmente $[K^+]_o$, sobre a interação por GJs. Para modular o acoplamento por GJs alteramos a tortuosidade do meio extracelular e o total de unidades funcionais ou compartimentos do modelo. Também investigamos o caso no qual a corrente por GJs é nula para avaliar os efeitos isolados da interação neuronal pelas CIs extracelulares. Apesar das AEs simuladas serem geradas na camada granular do GD, os fenômenos básicos por trás dos resultados podem ser aplicados para outras regiões hipocampais.

As simulações demonstram que o acoplamento por GJs é modulado pela variação das CIs no meio extracelular. Observamos diferenças nas frequências médias de disparo e na CFM quando alteramos a tortuosidade e o tamanho da rede. Estudos anteriores demonstraram as propriedades sincronizadoras das GJs. No entanto, pelo nosso conhecimento, ainda não havia sido feito um estudo dos efeitos do acúmulo de CIs sobre esse acoplamento. Isto enfatiza a importância da regulação da homeostase celular para prevenir o aparecimento de atividades epileptiformes como as exploradas nesta tese. Logo, este estudo adiciona mais um dado em favor do desenvolvimento de terapias para as epilepsias que também tenham como foco a homeostase e os acoplamentos não-sinápticos.

Uma questão levantada pelas análises e que necessita de maiores esclarecimentos é a redução de $\langle f_{spike} \rangle$ com o aumento do acoplamento por GJs, sobre a qual há evidências relacionando-a à estabilidade de estados sincronizados, discutida no capítulo 5. Além dessa questão, é necessário comparar os nossos resultados com dados experimentais, pois a previsão de fenômenos experimentais é um dos objetivos da modelagem computacional. Esses experimentos incluiriam o registro intracelular de um conjunto de neurônios, com a modulação farmacológica das GJs. A tortuosidade se altera a depender da região estudada e das modificações dos volumes celulares. Deste modo, para simular as alterações de tortuosidade, a sugestão é investigar outras regiões hipocampais bem como impor

condições para variação dos volumes celulares. Um exemplo é alterar a osmolaridade da solução de perfusão. Ainda, para um estudo completo sobre a influência de acoplamentos não sinápticos é preciso incluir uma análise dos efeitos de campo modulado pelas demais interações não-sinápticas.

O modelo também incorpora um sistema de recaptação glial. Vários estudos apontam para uma falha nesse sistema, como causa para o desequilíbrio homeostático representado pelo acúmulo de $[K^+]_o$. Esta é uma questão relevante para entender a gênese das atividades não-sinápticas.

O uso de um modelo computacional detalhado é uma ferramenta poderosa para fazer previsões, talvez revelando mecanismos e efeitos importantes para o entendimento de processos celulares e suas disfunções, como na epilepsia. Neste contexto, as contribuições desta tese incluem:

- Previsão dos efeitos de um aumento de $[K^+]_o$ sobre a interação por GJs, incluindo alterações das amplitudes e frequências de disparo, bem como sobre a sincronização entre pares de neurônios.
- Exploração dos efeitos de um parâmetro geométrico do ME, a tortuosidade, atuando como controle de $[K^+]_o$.
- Previsão sobre de que forma o acoplamento via concentrações iônicas extracelulares alteram, mais uma vez, os disparos e sincronização entre neurônios.

Referências

- Addison, P. S., Watson, J. N., e Feng, T. (2002). Low-oscillation complex wavelets. *Journal of Sound and Vibration*, 254:733–62.
- Agnati, L. F., Leo, G., Zanardi, A., Genedani, S., Rivera, A., Fuxe, K., e Guidolin, D. (2006). Volume transmission and wiring transmission from cellular to molecular networks: history and perspectives. *Acta Physiol.*, 187:329–34.
- Alger, B. E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog. Neurobiol.*, 68:247–86.
- Almeida, A. C. G., Rodrigues, A. M., Scorza, F. A., Cavalheiro, E. A., Teixeira, H. Z., Duarte, M. A., Silveira, G. A., e Arruda, E. Z. (2008). Mechanistic hypotheses for nonsynaptic epileptiform activity induction and its transition from the interictal to ictal state-computational simulation. *Epilepsia*, 49:1908–24.
- Almeida, A. C. G., Teixeira, H. Z., Duarte, M. A., e Infantosi, A. F. C. (2004). Modeling extracellular space electrodiffusion during leões spreading depression. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 51(3):450–58.
- Amzica, F. e Steriade, M. (1999). Spontaneous and artificial activation of neocortical seizures. *J. Neurophysiol.*, 82:3123–38.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., e O’Keefe, J. (2006). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, New York.
- Andrade-Valença, L. P. A., Valena, M. M., Velasco, T. R., e Leite, J. P. (2006). Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. *J. Epilepsy Clin. Neurophysiol.*, 12:31–6.
- Ashcroft, N. W. e Mermin, N. D. (1976). *Solid State Physics*. Harcourt College Publishers, Fort Worth.
- Avoli, M. (2001). Do interictal discharges promote or control seizures? Experimental evidence from an in vitro model of epileptiform discharge. *Epilepsia*, 42(Suppl. 3):2–4.

- Azouz, R., Alroy, G., e Yaari, Y. (1997). Modulation of endogenous firing patterns by osmolarity in rat hippocampal neurones. *J. Physiol.*, 502:175–87.
- Bazhenov, M., Timofeev, I., Fröhlich, F., e Sejnowski, T. J. (2008). Cellular and network mechanisms of electrographic seizures. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 5(1):45–57.
- Bernard, C. (2005). *Models of Seizures and Epilepsy*, Hippocampal slices: designing and interpreting studies in epilepsy research, 59–72. Academic Press, San Diego.
- Bikson, M., Baraban, S. C., e Durand, D. M. (2002). Conditions sufficient for nonsynaptic epileptogenesis in the CA1 region of hippocampal slices. *J. Neurophysiol.*, 87:62–71.
- Bikson, M., Hahn, P. J., Fox, J. E., e Jefferys, J. G. (2003). Depolarization block of neurons during maintenance of electrographic seizures. *J. Neurophysiol.*, 90:2402–2408.
- Canavier, C. C., Clark, J. W., e Byrne, J. H. (1991). Simulation of the bursting activity of neuron RI-5 in aplysia : Role of ionic currents, calcium balance, and modulatory transmitters. *J. Neurophysiol.*, 66:2107–24.
- Chavez, M., Besserve, M., Adam, C., e Martinerie, J. (2006). Towards a proper estimation of phase synchronization from time series. *J. Neurosc. Meth.*, 154:149–60.
- Chesler, M. (2003). Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol. Rev.*, 83:1183–221.
- Chow, C. C. e Koppel, N. (2000). Dynamics of spiking neurons with electrical coupling. *Neural Comput.*, 12:1643–78.
- Clapcote, S. J., Duffya, S., Xiea, G., Kirshenbaum, G., Becharada, A. R., Schackd, V. R., Petersend, J., Sinaia, L., Saaba, B. J., Lerche, J. P., Minassianc, B. A., Ackerleye, C. A., Sledc, J. G., Cortezc, M. A., Hendersonc, J. T., Vilsend, B., e Roderad, J. C. (2009). Mutation I810N in the β_3 isoform of Na^+, K^+ -ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS. *PNAS*, 106(33):14085–90.
- Cover, T. M. e Thomas, J. A. (2006). *Elements of Information Theory*. John Wiley and Sons, New Jersey.
- Cressman Jr., J. R., Ullah, G., Ziburkus, J., Schiff, S. J., e Barreto, E. (2009). The influence of sodium and potassium dynamics on excitability, seizures, and the stability of persistent states: I. Single neuron dynamics. *J. Comput. Neurosci.*, 26:159–70.
- da Silva, A. V. e Cavaleiro, E. A. (2004). Epilepsia: uma janela para o cérebro. http://www.multiciencia.unicamp.br/art05_3.htm.

- da Silva, F. H. L. (2002). *Encyclopedia of the Human Brain*, Electrical potentials, 147–67. Academic Press, San Diego.
- Dudek, F. E. (2004). *Epilepsy: Scientific Foundations of Clinical Practice*, Nonsynaptic mechanisms in seizures and epileptogenesis: targets for clinical management?, 91–105. Marcel Dekker Inc, New York.
- Dudek, F. E. e Sutula, T. P. (2007). Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective. *Prog. Brain Res.*, 163:755–73.
- Dudek, F. E., Yasumura, T., e Rash, J. E. (1998). Non-synaptic mechanisms in seizures and epileptogenesis. *Cell Biol. Int.*, 22:793–805.
- Dzhala, V. I., Talos, D. M., Sdrulla, D. A., Brumback, A. C., Mathews, G. C., Benke, T. A., Delpire, E., Jensen, F. E., e Staley, K. J. (2005). NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat. Med.*, 11(11):1205–13.
- Engel, J., Pedley, T. A., Aicardi, J., Dichter, M. A., e Mosh, S. (2007). *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Engel, J. e Scharwtzkroin, P. A. (2005). *Models of Seizures and Epilepsy*, What should be modeled ?, 1–14. Academic Press, San Diego.
- Fagundes, D. J. e Taha, M. O. (2004). Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 19:59–65.
- Fertziger, A. P. e Ranck, J. B. (1970). Potassium accumulation in interstitial space during epileptiform seizures. *Exp. Neurol.*, 26:571–85.
- Fox, J. E., Bikson, M., e Jefferys, J. G. R. (2004). Tissue resistance changes and the profile of synchronized neuronal activity during ictal events in the low-calcium model of epilepsy. *J. Neurophysiol.*, 92:181–8.
- Fröhlich, F., Bazhenov, M., Iragui-Madoz, V., e Sejnowski, T. J. (2008a). Potassium dynamics in the epileptic cortex: new insights on an old topic. *Neuroscientist*, 14:422–33.
- Fröhlich, F., Timofeev, I., Sejnowski, T. J., e Bazhenov, M. (2008b). *Computational Neuroscience in Epilepsy*, Extracellular potassium dynamics and epileptogenesis, 407–27. Academic Press, San Diego.
- Fukuda, A. (2005). Diuretic soothes seizures in newborns. *Nat. Med.*, 11(11):1153–4.
- Galarreta, M. e Hestrin, S. (1999). A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature*, 401:72–5.

- Gomes, M. M. (2006). História da epilepsia: um ponto de vista epistemológico. *J. Epilepsy Clin. Neurophysiol.*, 12:161–67.
- Gorji, A., Stemmer, N., Rambeck, B., Jrgens, U., May, T., Pannek, H. W., Behne, F., Ebner, A., Straub, H., e Speckmann, E. J. (2006). Neocortical microenvironment in patients with intractable epilepsy: Potassium and chloride concentrations. *Epilepsia*, 47(2):297–310.
- Green, J. D. (1964). The hippocampus. *Physiol. Rev.*, 44:561–608.
- Guedes, F. A., Galvis-Alonso, O. Y., e Leite, J. P. (2006). Plasticidade neuronal associada à epilepsia do lobo temporal mesial: Insights a partir de estudos em humanos e em modelos animais. *J. Epilepsy Clin. Neurophysiol.*, 12(supl. 1).
- Hille, B. (2001). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Hodgkin, A. L. e Huxley, A. F. (1952). Hodgkin, a. l.; huxley. *J. Physiology*, 117:500–44.
- Holt, G. R. (1998). *A Critical Reexamination of Some Assumptions and Implications of Cable Theory in Neurobiology*. Tese de Doutorado, California Institute of Technology, Pasadena.
- Horisberger, J. (2004). Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology*, 19:377–87.
- Hormuzdi, S. G., Filippov, M. A., Mitropoulou, G., Monyer, H., e Bruzzone, R. (2004). Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochim. Biophys. Acta*, 1662:113–37.
- Hrabitová, S. e Nicholson, C. (2007). *Electrochemical Methods for Neuroscience*, Biophysical properties of brain extracellular space explored with ion-selective microelectrodes, integrative optical imaging and related techniques, 167–204. CTC, Boca Raton.
- Izhikevich, E. (2007). *Dynamical Systems in Neuroscience: The Geometry of Excitability and Bursting*. MIT Press, Cambridge.
- Jackson, M. B. (2006). *Molecular and Cellular Biophysics*. Cambridge University Press, New York.
- Jefferys, J. G. R. (1995). Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions. *Physiol. Rev.*, 75:689–723.
- Jefferys, J. G. R. e Haas, H. L. (1982). Synchronized burstings of CA1 pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature*, 300:448–50.

- Jensen, M. S. e Yaari, Y. (1988). The relationship between interictal and ictal paroxysms in an in vitro model of focal hippocampal epilepsy. *Ann. Neurol.*, 24:591–8.
- Jensen, M. S. e Yaari, Y. (1997). Role of intrinsic burst firing, high potassium accumulation and electrical coupling in the elevated potassium model of hippocampal epilepsy. *J. Neurophysiol.*, 77:1224–33.
- Kager, H., Wadman, W. J., e Somjen, G. G. (2002). Conditions for triggering of spreading depression studied with computer simulations. *J. Neurophysiol.*, 88:2700–12.
- Kager, H., Wadman, W. J., e Somjen, G. G. (2007). Seizure-like afterdischarges simulated in a model neuron. *J. Comput. Neurosci.*, 22:105–28.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., e Jessel, T. M., editors (2003). *Princípios da Neurociência*. Manole, Rio de Janeiro.
- Kaplan, J. H. (1985). Ion movements through the sodium pump. *Ann. Rev. Physiol.*, 47:535–44.
- Kepler, T. B., Marder, E., e Abbott, L. F. (1990). The effect of electrical coupling on the frequency of model neuronal oscillators. *Science*, 248:83–5.
- Kilb, W., Dierkes, P. W., Syková, E., Vargova, L., e Luhma, H. J. (2006). Hypoosmolar conditions reduce extracellular volume fraction and enhance epileptiform activity in the CA3 region of the immature rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.*, 84:119–29.
- Koninck, Y. (2007). Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. *Current Opinion in Pharmacology*, 7:93–9.
- Konnerth, A., Heinemann, U., e Yaari, Y. (1984). Slow transmission of neural activity in hippocampal area CA1 in absence of active chemical synapses. *Nature*, 307:69–71.
- Konnerth, A., Heinemann, U., e Yaari, Y. (1986). Nonsynaptic epileptogenesis in the mammalian hippocampus in vitro. I. Development of seizure-like activity in low extracellular calcium. *J. Neurophysiol.*, 56:409–23.
- Kraskov, A. (2004). *Synchronization and Interdependence Measures and their Applications to the Electroencephalogram of Epilepsy Patients and Clustering of Data*. Tese de Doutorado, John von Neumann Institute for Computing, Jülich.
- Lang, F., Buch, G. L., Ritter, M., e Volkl, H. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.*, 78:247–306.
- Lytton, W. W. (2008). Computer modelling of epilepsy. *Nature Rev. Neurosci.*, 9:626–37.

- MacVicar, B. A. e Dudek, F. E. (1982). Electrotonic coupling between granule cells of rat dentate gyrus: physiological and anatomical evidence. *J. Neurophysiol.*, 47:579–92.
- McCormick, D. A. e Contreras, D. (2001). On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu. Rev. Physiol.*, 63:815–46.
- McNamara, J. O. (1994). Cellular and molecular basis of epilepsy. *J. Neurosci.*, 14(6):3113–425.
- Mormann, F., Lehnertz, K., David, P. E., e Elger, C. (2000). Mean phase coherence as a measure for phase synchronization and its application to the EEG of epilepsy patients. *Physica D*, 144:358–69.
- Morris, C. G. e Maisto, A. A. (2001). *Psychology: An Introduction*. Prentice Hall, New Jersey.
- Nicholson, C. (2001). Diffusion and related transport mechanisms in brain tissue. *Rep. Prog. Phys.*, 64:815–84.
- Nunez, P. L. e Srinivasan, R. (2005). *Electric Fields of the Brain: The Neurophysics of EEG*. Oxford University Press, New York.
- O’Keefe, J. e Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford University Press, New York.
- Oppenheim, A. V., Schafer, R., e Buck, J. R. (1999). *Discrete-Time Signal Processing*. Prentice Hall, New Jersey.
- Pan, E. e Stringer, J. L. (1996). Burst characteristics of dentate gyrus granule cells: Evidence for endogenous and nonsynaptic properties. *J. Neurophysiol.*, 75:124–32.
- Pan, E. e Stringer, J. L. (1997). Role of potassium and calcium in the generation of cellular bursts in the dentate gyrus. *J. Neurophysiol.*, 77:2293–9.
- Park, E. e Durand, D. M. (2006). Role of potassium lateral diffusion in non-synaptic epilepsy: A computational study. *J. Theor. Biol.*, 238:666–82.
- Park, E. H., Feng, Z. H., e Durand, D. M. (2008). Diffusive coupling and network periodicity: a computational study. *Biophys. J.*, 95:1126–37.
- Payne, J. A. (1997). Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for $[K^+]_o$ regulation. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)*, 273(42):C1516–25.
- Perez-Velazquez, J. L. e Carlen, P. L. (2000). Gap junctions, synchrony and seizures. *Trends Neurosci.*, 23:68–74.

- Perez-Velazquez, J. L., Carlen, P. L., e Skinner, F. K. (2001). Artificial electrotonic coupling affects neuronal firing patterns depending upon cellular characteristics. *Neuroscience*, 103:841–9.
- Perez-Velazquez, J. L., Valiante, T. A., e Carlen, P. L. (1994). Modulation of gap junctional mechanisms during calcium-free induced field burst activity: a possible role for electrotonic coupling in epileptogenesis. *J. Neurosci.*, 14:4308–17.
- Pfeuty, B., Mato, G., Golomb, B., e Hansel, D. (2003). Electrical synapses and synchrony: The role of intrinsic currents. *J. Neurosci.*, 23:6280–94.
- Pikovsky, A., Rosenblum, M. G., e Kurths, J. (2001). *Synchronization: A Universal Concept in Nonlinear Sciences*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Pikovsky, A., Rosenblum, M. G., Osipov, G. V., e Kurths, J. (1997). Phase synchronization of chaotic oscillators by external driving. *Physica D*, 104:219–38.
- Postnov, D. E., Ryazanova, L. S., Mozekild, E., e Sosnovtseva, O. (2006). Neural synchronization via potassium signaling. *Int. J. Neural Syst.*, 16:99–109.
- Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., e Flannery, B. P. (1992). *NUMERICAL RECIPES in Fortran 90*. Cambridge University Press, New York.
- Pumain, R., Menini, C., Heinemann, U., Louvel, J., e Silva-Barrat, C. (1985). Chemical synaptic transmission is not necessary for epileptic seizures to persist in the baboon papio papio. *Exp. Neurol.*, 89:250–8.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia, A., McNamara, J. O., e Williams, S. M. (2004). *Neuroscience*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Quiroga, R. Q., Kraskov, A., Kreuz, T., e Grassberger, P. (2002). Performance of different synchronization measures in real data: a case study on electroencephalographic signals. *Phys. Rev. E*, 65:041903.
- Quyen, M. L. V., Foucher, J., Rodriguez, J. P. L. E., Lutz, A., Martinerie, J., e Varela, F. J. (2001). Comparison of Hilbert transform and wavelet methods for the analysis of neuronal synchrony. *J. Neurosci. Met.*, 111(2):83–98.
- Rodrigues, A. M. (2003). Modelo eletroquímico de atividades epileptiformes sustentadas por modulações não-sinápticas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del-Rei.
- Rosenblum, M. e Kurths, J. (1998). *Nonlinear Analysis of Physiological Data, Analysing Synchronization Phenomena from Bivariate Data by Means of the Hilbert Transform*, 91–9. Springer, Berlin.

- Rosenblum, M. G. e Pikovsky, A. (1996). Phase synchronization of chaotic oscillators. *Phys. Rev. Lett.*, 76:1804–7.
- Rosenblum, M. G., Pikovsky, A., Kurths, J., Schfer, C., e Tass, P. (2001). *Handbook of Biological Physics, Neuro-informatics and Neural Modeling, Vol.4*, Phase synchronization: from theory to data analysis, 279–321. Elsevier Science, Amsterdam.
- Russel, J. M. (2000). Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol. Rev.*, 80:211–76.
- Sanabria, E. R. G., Yacubian, E. M. T., e Cavaleiro, E. A. (2001). Epilepsia: perspectivas da pesquisa em modelos experimentais. *Ciência Hoje*, 29:26–33.
- Schweitzer, J. S., Patrylo, P. R., e Dudek, F. E. (1992). Prolonged field bursts in the dentate gyrus: dependence on low calcium, high potassium, and nonsynaptic mechanisms. *J. Neurophysiol.*, 68:2016–25.
- Sherman, A. e Rinzel, J. (1991). Synchronization of pancreatic β -cells by gap junctions. *Biophys. J.*, 59:547–59.
- Sherman, A. e Rinzel, J. (1992). Rhythmogenic effects of weak electrotonic coupling in neuronal models. *PNAS*, 89:2471–74.
- Snow, R. W. e Dudek, F. E. (1986). Evidence for neuronal interactions by electrical field effects in the CA3 and dentate regions of rat hippocampal slices. *Brain Res.*, 367:292–5.
- Soltesz, I. e Staley, K. (2008). *Computational Neuroscience in Epilepsy*. Academic Press, San Diego.
- Somjen, G. G. (2004). *Ions in the Brain: Normal Function, Seizures and Stroke*. Oxford University Press, New York.
- Somjen, G. G., Kager, H., e Wadman, W. J. (2008). Computer simulations of neuron-glia interactions mediated by ion flux. *J. Comput. Neurosci.*, 25(2):349–65.
- Stokes, C. L. e Rinzel, J. (1993). Diffusion of extracellular K^+ can synchronize bursting oscillations in a model islet of langerhans. *Biophys. J.*, 65:597–607.
- Sweatt, D. (2003). *Mechanisms of memory*. Academic Press, San Diego.
- Syková, E. (2004). Extrasynaptic volume transmission and diffusion parameters of the extracellular space. *Neuroscience*, 129:861–76.
- Syková, E. e Nicholson, C. (2008). Diffusion in brain extracellular space. *Physiol. Rev.*, 88:1277–340.

- Tas, P. W., Massa, P. T., Kress, H. G., e Koschel, K. (1987). Characterization of an $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}$ co-transport in primary cultures of rat astrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 903:411–6.
- Tass, P., Rosenblum, M. G., Weule, J., Kurths, J., Pikovsky, A., Volkmann, J., Schnitzler, A., e Freund, H.-J. (1998). Detection of n:m phase locking from noisy data: application to magnetoencephalography. *Phys. Rev. Lett.*, 81:3291–4.
- Taupin, P. (2007). *The hippocampus : neurotransmission and plasticity in the nervous system*. Nova Biomedical Books, New York.
- Taylor, C. P. e Dudek, F. E. (1982). Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science*, 218:810–2.
- Torrence, C. e Compo, G. P. (1998). A practical guide to wavelet analysis. *Bull. Am. Meteor. Soc.*, 79:61–78.
- Traub, R. D., Contreras, D., e Whittington, M. A. (2008). *Computational Neuroscience in Epilepsy*, Cellular and network mechanisms of oscillations preceding and perhaps initiating epileptic discharges, 335–55. Academic Press, San Diego.
- Traynelis, S. F. e Dingledine, R. (1988). Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *J. Neurophysiol.*, 59:259–76.
- Ullah, G., Jr., J. R. C., Barreto, E., e Schiff, S. J. (2009). The influence of sodium and potassium dynamics on excitability, seizures, and the stability of persistent states: II. Network and glial dynamics. *J. Comput. Neurosci.*, 26:170–83.
- Vakman, D. E. e Vainshtein, L. A. (1977). Amplitude, phase, frequency: fundamental concepts of oscillation theory. *Sov. Phys. Usp.*, 20:1002–16.
- Varona, P., Ibarz, J. M., Lopez-Aguado, L., e Herreras, O. (2000). Macroscopic and subcellular factors shaping population spikes. *J. Neurophysiol.*, 83:2192–208.
- Weer, P. D., Gadsby, D. C., e Rakowski, R. F. (1988). Voltage dependence of the Na-K pump. *Ann. Rev. Physiol.*, 50:225–41.
- Wendling, F. (2005). Neurocomputational models in the study of epileptic phenomena. *J. Clin. Neurophysiol.*, 22:285.
- Wendling, F. (2008). Computational models of epileptic activity: a bridge between observation and pathophysiological interpretation. *Expert Rev. Neurother.*, 8:889–96.

-
- Xiong, A. Q. e Stringer, J. L. (2001). Prolonged bursts occur in normal calcium in hippocampal slices after raising excitability and blocking synaptic transmission. *J. Neurophysiol.*, 86:2625–8.
- Yaari, Y., Konnerth, A., e Heinemann, U. (1986). Nonsynaptic epileptogenesis in the mammalian hippocampus in vitro. II. Role of extracellular potassium. *J. Neurophysiol.*, 56:424–38.