VIVIAN DE ALVARENGA GUEDES

ONTOGÊNESE DE CONEXINAS NO CEREBELO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

VIVIAN DE ALVARENGA GUEDES

ONTOGÊNESE DE CONEXINAS NO CEREBELO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto

Versão Original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Guedes, Vivian de Alvarenga.

Ontogênese de conexinas no cerebelo / Vivian de Alvarenga
Guedes. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Luiz Roberto Giorgetti de Britto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de
concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Papel das
conexinas no desenvolvimento do sistema nervoso.

Versão do título para o inglês: Ontogenesis of connexins in the
cerebellum

Descritores: 1. Conexinas 2. Cerebelo 3. Ontogênese
4. Diferenciação celular 5. Proliferação celular I. Britto, Luiz Roberto
Giorgetti de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana
III. Título.

ICB/SBIB0227/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vivian de Alvarenga Guedes.

Título da Tese: Ontogênese de conexinas no cerebelo.

Orientador(a): Luiz Roberto Giorgetti de Britto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Linus Prestes, 2415 - CEP. 06508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cepa@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **144** nas fls. **94** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Luiz Roberto G. de Britto, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Ontogênese de Conexinas no Encéfalo de Pintos** do qual participam o(s) alunos **Vivian de Alvarenga Guedes e o pesquisador Alexandre Hiraoki Kihara**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **23.11.2010**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 25 de novembro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário-suplente
CEUA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **110** nas fls. **50** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Luiz Roberto Giorgetti de Britto** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Ontogênese de conexinas no encéfalo de ratos**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Vivian de Alvarenga Guedes e o pesquisador Alexandre Hiroaki Kihara**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **22.11.2007**.

São Paulo, 23 de novembro de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

À minha querida avó
Elza Lopes de Alvarenga

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Alexandre Kihara, agradeço pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal. Seu dinamismo, entusiasmo e amor pelo que faz são contagiantes.

Ao Prof. Britto, muito obrigada por ter me recebido em seu laboratório, por todo o suporte e pela muita paciência. Você é um exemplo de competência profissional.

Ao Prof. Luiz Eduardo Ribeiro do Valle, Prof. Raquel Simoni Pires e Dr. Mauro Leonelli pelas rica discussão e pelas sugestões valiosas no exame de qualificação.

Ao Prof. Ribeiro, muito obrigada por todas as longas discussões, conselhos profissionais e sobre a vida, desde meu primeiro ano como aluna de graduação. Seu amor pelo conhecimento sempre foi uma inspiração para mim.

À Profa. Raquel, muito obrigada pela disposição para discutir ideias e ouvir minhas dúvidas.

Ao Mauro, obrigada pelas excelentes sugestões, pela boa prosa, pela amizade.

Ao Adilson da Silva Alves, agradeço pela ajuda inestimável e pela boa-vontade, mesmo com toda a minha inexperiência nas técnicas de laboratório. Muito obrigada pela amizade e amparo. Seu altruísmo é impressionante. E obrigada por trazer para a minha vida suas queridas mãe e irmã. Dona Francisca e Adalci, serei eternamente grata pelo carinho e acolhimento.

À querida Erika Kinjo, minha companheira de muitos fins de semana e madrugadas de trabalho, de longas conversas regadas a cafés e confidências. Vou sentir demais a sua falta.

Ao Guilherme, padrinho, amigo, doce, pessoa maravilhosa e fantástico colega de trabalho, meu muito obrigada por tantas coisas que seria difícil enumerar.

À Carol Margonatto, madrinha, alegre, sensível, divertida, uma menina guerreira. Muito obrigada pela amizade.

A Cecília Café, inteligente, talentosa, engraçadíssima, generosa. Muito obrigada por estar sempre disposta a me socorrer e pela excelente companhia.

À Carol Real, mestre dos programas de computador, trabalhadora e engraçada, agradeço por toda a sua disponibilidade.

À Kallene Summer, Taisa Oliveira e Profa. Andrea Torrão, agradeço principalmente, pelo suporte no fim do doutorado. Kallene, o que seria de mim sem seus conselhos, sua comida, música, dicas de beleza e injeções de corticoide. Muito obrigada pela amizade.

À Vera Paschon agradeço, especialmente, pelo valioso suporte no início do doutorado.

Muito obrigada a todos os colegas de trabalho e amigos que passaram pela minha vida nesses anos de doutorado, Angélica Ayochiy, Gabriela Chaves, Ana Ferreira, Marina Sorretino, Carol Alencar, Daniel Martins, Rosana Pagano, Marúcia Chacur, Caio Marzucanti, Cleyton Sobrinho, Renata Toscano. O apoio de vocês foi fundamental.

À Maíra, pela sua conversa inteligente, pela companhia divertida e grande amizade. Quem diria que pessoas tão diferentes poderiam ser irmãs de alma.

Muito obrigada aos funcionários do ICB e da USP e, especialmente, ao pessoal das secretarias, bibliotecas e biotérios. Um obrigada especial ao Zé Maria, pela sua grande dedicação.

Agradeço ainda aos amigos inesquecíveis do laboratório do Prof. Ribeiro., em especial, Camila Bruder, Mariana Voos, Aline Lacerda e Luana Righi.

Muito obrigada a todos os professores do ICB-USP e de todos os outros estágios da minha vida.

Aos amigos da Fisio USP, especialmente, Leda Silveira, Patrícia Penha, Simone Frisanco, Dani Penteado, Eliane Kanayama e, claro, Dani Melo e Cássio Bertogma, muito obrigada pela amizade, companheirismo e suporte. Adoro todos vocês!

Muito obrigada aos amigos de toda vida lá de Itanhandu. Vocês são uma parte de mim.

A minha família e amigos americanos, agradeço pelo acolhimento e carinho, especialmente ao Jacob Clara e Jayme Clara. Jayme Clara, você é a melhor sogra do mundo!

Ao meu marido Joseph Clara, meu amor, companheiro de todas as horas, melhor amigo, muito obrigada pelo amor e apoio incondicionais.

A toda a minha grande família, avós, tios, primos, pais e irmãos, obrigada por me lembrarem sempre de onde eu vim. Muito obrigada pelo carinho e por acreditarem no meu potencial. A meus pais, Valdir Lamin Guedes e Marisa de Alvarenga Guedes, muito obrigada por cuidarem de mim, por todo o seu trabalho e empenho em dar aos seus filhos um futuro melhor, pelo suporte, apoio e amor. À minha irmã Natália e ao meu irmão Valdir, obrigada pelo incentivo, por todas as conversas, por todas as experiências que compartilhamos. Eu me orgulho muito de tê-los como família!

Obrigada ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

“Obstáculos são as coisas assustadoras
que você vê quando tira seus olhos do seu objetivo”
Henry Ford (1863-1947)

RESUMO

Guedes, VA. Ontogênese de conexinas no cerebelo. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

As conexinas (Cxs) pertencem a uma família multigênica de proteínas constituintes de junções comunicantes (JCs). No sistema nervoso de vertebrados, as Cxs constituem as sinapses elétricas e são importantes para a fisiologia neuronal e glial. Durante o desenvolvimento, canais intercelulares e hemicanais compostos por Cxs associam-se a processos como a proliferação, migração e diferenciação celular. A Cx43 e a Cx36 são observadas desde os estágios iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso. Nos vertebrados adultos, a Cx43 e a Cx36 são amplamente expressas e consideradas, respectivamente, a principal Cx glial e neuronal. O padrão de expressão espaço-temporal da Cx43 e da Cx36 ainda é pouco compreendido no cerebelo. Neste estudo, analisamos a ontogênese da Cx43 e da Cx36 no cerebelo de galinha. Por meio da combinação das técnicas de PCR em tempo real, Western blotting e imuno-histoquímica, detectamos pela primeira vez a Cx43 e a Cx36 no cerebelo de aves. Além disso, encontramos um aumento na expressão de Cx43 e Cx36 durante o desenvolvimento cerebelar. O aumento dos níveis proteicos da Cx36 pode ser associado à regulação gênica e a mecanismos pós-transcricionais. Cx43 e a Cx36 foram observadas em todas as regiões do córtex cerebelar embrionário. A Cx43 foi detectada nas fibras radiais da glia de Bergmann em pontos de contato com células granulares em migração. Observamos a presença de Cx36 na camada germinativa externa do cerebelo, onde se localizam precursores de células granulares. A Cx36 foi também observada em associação a grupos de células granulares em migração na camada molecular. Os resultados de experimentos de dupla-marcação mostram que a Cx43 localiza-se em astrócitos da substância cinzenta, astrócitos da substância branca e na glia de Bergmann. Pontos imunorreativos para a Cx43 foram observados na superfície de axônios e em processos de oligodendrócitos. Portanto, é possível que a Cx43 esteja presente em JCs acoplando neurônios e oligodendrócitos a astrócitos. A Cx36 encontra-se principalmente em dendritos de células da camada granular, provavelmente células de Golgi. Nos períodos embrionário e pós-natal, a Cx36 foi observada em associação a receptores de glutamato do tipo mGluR2/3. Nossos resultados sugerem que a Cx43 e a Cx36 estejam relacionadas aos mecanismos que regulam a histogênese do córtex cerebelar e à maturação pós-natal de conexões sinápticas. A distribuição da Cx36 e Cx43 no córtex cerebelar de galinha indica que existem similaridades e diferenças em comparação a outras espécies de vertebrados.

Palavras-chave: Conexinas. Cerebelo. Ontogênese. Diferenciação celular. Proliferação celular.

ABSTRACT

Guedes VA. Expression of connexins in the developing cerebellum. [Ph. D. thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Connexins (Cxs) constitute a multigenic family of gap junction (GJ) proteins. In the vertebrate nervous system, Cxs form electrical synapses and are important for neuronal and glial physiology. During development, Cx channels and hemichannels are associated with processes such as cell proliferation, migration and differentiation. Cx43 and Cx36 are found in the early development of the nervous system. In the mature brain, Cx43 and Cx36 are widely expressed and are considered as the major glial and neuronal connexins, respectively. The spatiotemporal expression of Cx43 and Cx36 in the cerebellum is still poorly understood. In this study, we investigated the Cx43 and Cx36 ontogenesis in the chick cerebellum. By using a combination of real-time PCR, Western blotting and immunohistochemistry, we were able to detect for the first time Cx43 and Cx36 in the avian cerebellum. We also found increased gene expression and protein levels of Cx43 and Cx36 in the developing cerebellum. The higher protein levels of Cx36 were associated with both gene expression and post-transcriptional regulation mechanisms. Cx43 and Cx36 were detected in all layers of the embryonic cerebellar cortex. Cx43 was found in contact points between radial Bergmann glia fibers and migrating granule cells. Cx36 was observed in the cerebellum external germinative layer, from where granule cells precursors originate. Additionally, Cx36 was seen in close association with groups of granule cells migrating in the molecular layer. In the postnatal cerebellum, double-labeling experiments showed that Cx43 was expressed in gray and white matter astrocytes, and in Bergmann glial cells. We also identified Cx43 punctate labeling on the surface of axons and oligodendrocyte processes. Therefore, Cx43 may be present in GJs coupling neurons and oligodendrocytes to astrocytes. Cx36 was mainly found in dendrites of granular layer cells, most likely Golgi cells. In the embryonic and postnatal periods, Cx36 was located in close association with the mGluR2/3-type glutamate receptor. Our results suggest that Cx43 and Cx36 are related to mechanisms that regulate the cerebellar cortex histogenesis and the postnatal maturation of synaptic connections. The spatial distribution of Cx43 and Cx36 in the chick cerebellum shows similarities and differences when compared to other vertebrate species.

Key-words: Connexin. Cerebellum. Ontogenesis. Cell differentiation. Cell proliferation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 CXS E JUNÇÕES COMUNICANTES	18
1.2 CONEXINAS NO SISTEMA NERVOSO	23
1.2.1 Sistema nervoso adulto	23
1.2.1.1 <u>Conexinas e comunicação neuronal</u>	23
1.2.1.2 <u>Conexinas e células da glia</u>	26
1.2.2 Desenvolvimento do SN	299
1.3 CEREBELO	35
1.3.1 Anatomia do cerebelo	36
1.3.1.1 <u>Camada molecular</u>	38
1.3.1.2 <u>Camada de células de Purkinje</u>	38
1.3.1.3 <u>Camada granular</u>	40
1.3.2 Histogênese do córtex cerebelar	41
2 OBJETIVOS.....	499
2.1 OBJETIVO GERAL	49
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
3.1 ANIMAIS	50
3.2 PCR EM TEMPO REAL	51
3.3 WESTERN BLOTTING	52
3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA	53
3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS	56
4 RESULTADOS.....	58
4.1 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CONEXINAS	58
4.2 NÍVEIS PROTEÍCOS DE CONEXINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CEREBELO..	62
4.3 PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE CONEXINAS NO CÓRTEX CEREBELAR	65
4.3.1 Conexina 43	65

4.3.2 <i>Conexina 36</i>	77
5 DISCUSSÃO.....	86
5.1 CONEXINA 43.....	87
5.1.1 <i>A Cx43 na glia radial</i>	89
5.1.2 <i>A Cx43 e a formação de sinapses no córtex cerebelar</i>	91
5.1.3 <i>Expressão de conexina 43 em astrócitos no período pós-natal</i>	94
5.2 CONEXINA 36.....	100
5.2.1 <i>A Cx36 associa-se a células granulares em diferenciação</i>	102
5.2.2 <i>A Cx36 no córtex cerebelar pós-natal</i>	105
5.2.3 <i>A Cx36 e o mGluR2/3 no córtex cerebelar</i>	107
5.2.4 <i>Sinapses elétricas no córtex cerebelar</i>	109
6 CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS.....	114

1 INTRODUÇÃO

As formas de vida mais complexas constituem-se de conjuntos de células especializadas. O crescimento, a reprodução e a sobrevivência dos organismos multicelulares dependem da associação entre diferentes mecanismos de comunicação celular. As células são capazes de responder a moléculas de sinalização por meio de receptores de membrana. Além disso, a comunicação entre células pode ocorrer na ausência da liberação de sinais no meio extracelular, por meio de especializações de membrana denominadas junções comunicantes (JCs) (Alberts et al., 2004; Goodenough e Paul, 2009).

As JCs consistem em aglomerados de canais protéicos conectando o citoplasma de células adjacentes. Esses canais intercelulares permitem a troca de íons, metabólitos e segundos mensageiros entre as células acopladas (Goodenough e Paul, 2009). Desse modo, a comunicação por JCs possibilita a sincronização elétrica e metabólica de grupos de células e a coordenação entre as respostas celulares (Meşe et al., 2007). As JCs foram observadas em todos os animais multicelulares já estudados, desde a hidra aos humanos (Fushiki et al., 2010).

Nos vertebrados, os canais intercelulares das JCs formam-se principalmente por proteínas de membrana denominadas conexinas (Cxs). Além disso, as Cxs podem participar de formas de sinalização independentes da formação de canais intercelulares (Bruzzone e Dermietzel, 2006; Prochnow e Dermietzel, 2008). As diversas isoformas de Cxs apresentam uma distribuição celular específica, podem ser alvos de sistemas regulatórios diferentes e interagir com vias de sinalização distintas (Goodenough et al., 2009). No sistema nervoso central (SNC), mecanismos de comunicação envolvendo as Cxs são importantes em diferentes etapas do desenvolvimento e na fisiologia do tecido maduro (Elias et al., 2008; Perea e Araque, 2010).

Neste trabalho, estudamos a ontogênese de Cxs no cerebelo de galinha. Os embriões de galinha consistem em um modelo tradicionalmente utilizado em biologia do desenvolvimento (Stern, 2005). Além disso, o estudo do SNC de aves permite a exploração de aspectos filogenéticos da comunicação celular. O cerebelo apresenta grande importância funcional, é muito suscetível a processos patológicos durante sua histogênese e associa-se a diferentes síndromes genéticas (Ramnani, 2006; Stoodley e Schmähmann, 2010). Além disso, o cerebelo constitui um modelo conveniente para o estudo da comunicação celular no SNC em função de suas características histológicas (Altmann e Bayer, 1997).

O padrão organizado e uniforme do córtex cerebelar facilita a identificação de camadas e circuitos cerebelares. Durante o desenvolvimento, as transformações morfológicas pelas quais passa o córtex cerebelar são bem compreendidas (Altmann e Bayer, 1997; Feirabend, 1990), o que facilita a associação da expressão de proteínas a eventos e tipos celulares específicos.

No entanto, apesar da morfologia do córtex cerebelar ser bem conhecida, existe pouca informação a respeito de como os mecanismos moleculares interagem nos circuitos do cerebelo maduro ou regulam seu processo de histogênese. Além disso, sabe-se pouco sobre a expressão de Cxs nos circuitos cerebelares e, principalmente, durante o desenvolvimento do cerebelo.

Serão revisadas a seguir as características moleculares das Cxs, sua distribuição celular e importância funcional no SNC. Além disso, serão discutidos os processos envolvidos no desenvolvimento do SNC e, por fim, aspectos importantes da anatomia, fisiologia e histogênese cerebelares.

1.1 CXS E JUNÇÕES COMUNICANTES

As Cxs formam uma grande família multigênica. No genoma de humanos, ratos e galinha foram descritos, respectivamente, 21, 20 e 15 diferentes genes que codificam Cxs (base de dados sobre genes do National Center for Biotechnology - NCBI). Com base em sua homologia, os genes das Cxs classificam-se em cinco grupos: alfa, beta, gama, delta e épsilon (Oyamada et al., 2012). O grupo épsilon é formado apenas pela Cx23, que foi observada no cristalino do camundongo e identificada no genoma do *Danio rerio* (Sonntag et al., 2009).

As diferentes isoformas de Cxs apresentam nomes alternativos de acordo com o sistema de nomenclatura usado. Por exemplo, a isoforma pode ser identificada pela sigla “Cx” seguida de sua massa molecular. Sendo assim, a “Cx43” refere-se à molécula da família das Cxs com massa molecular de 43 KDa (Meşe e Richard, 2007). As Cxs podem ser ainda classificadas de acordo com o grupo a que pertencem. Nesse caso, a Cx43 identifica-se como alfa 1, já que foi a primeira Cx do grupo alfa a ser identificada (Oyamada et al., 2012) (Tabela 1).

Diferentes regiões do organismo apresentam conjuntos distintos de Cxs. As mesmas isoformas de Cxs podem ser expressas em mais de um tipo celular e muitos, se não todos, os tipos celulares expressam mais de uma Cx. Cada Cx apresenta um padrão de distribuição específico. Algumas Cxs são expressas em grande variedade de tecidos e tipos celulares,

enquanto outras apresentam uma distribuição muito limitada (Elfgang et al., 1995; Goodenough e Paulo, 2009; Oyamada et al., 2011). A Cx 43 encontra-se presente em pelo menos 34 tecidos e 46 tipos celulares (Solan e Lampe, 2009). Por outro lado, a Cx57 foi localizada apenas em neurônios e em poucas regiões do SNC (Zappalà et al., 2010).

As Cxs já identificadas apresentam massa molecular entre 23 e 62 KDa (Oyamada et al., 2011). As Cxs atravessam toda a membrana citoplasmática, medindo cerca de 7,5 nm em seu eixo mais longo (Unwin and Zampighi, 1980). Cada molécula de conexina apresenta quatro domínios transmembrana (M1 a M4) em forma de α -hélice. As Cxs apresentam ainda duas alças extracelulares (C1 e C2), que são as regiões pelas quais os hemicanais de JCs interagem um com outro. C1 e C2 apresentam 31 e 34 aminoácidos, respectivamente, e conformação em folha beta. No citoplasma encontram-se as regiões C e N-terminais e uma alça intracelular formada pelo segmento entre M2 e M3 (Bennett et al., 1991; Bruzzone et al., 1996).

A região N-terminal contém aproximadamente 20 aminoácidos, sendo altamente conservada em todas as Cxs. Acredita-se que essa região da molécula de Cx está envolvida na regulação da abertura e fechamento dos canais por alterações de voltagem (Bennett et al., 1991). O domínio C-terminal varia em comprimento e consiste no maior determinante da massa da Cx. Além disso, essa região é alvo da ação de diversas proteínas envolvidas em processos regulatórios (Goodenough e Paul, 2009).

As Cxs aparecem no filo dos cordados, que inclui os animais vertebrados. Nos pré-cordados, as JCs são compostas de proteínas denominadas inexinas, que não são relacionadas às Cxs (Fushiki et al., 2010). Apenas recentemente proteínas homólogas às inexinas foram descritas em vertebrados e denominadas panexinas (Panx) (Bruzzone et al., 2003; Panchin, 2005). Três diferentes genes foram identificados no genoma de ratos e humanos: Panx1, Panx2 e Panx3. Os dois primeiros são expressos no encéfalo e outros tecidos, enquanto a Panx3 foi observada apenas em osteoblastos e fibroblastos sinoviais (Bruzzone et al., 2003). Acredita-se que as inexinas e panexinas possuem um ancestral em comum e são membros de uma mesma superfamília, enquanto as Cxs apresentam uma origem diferente (Fushiki et al., 2010).

JCs constituídas por Cxs foram descritas em quase todos os tecidos dos vertebrados adultos (Goodenough e Paul, 2009). As disfunções de JCs são relacionadas a um amplo espectro de doenças em humanos, incluindo síndromes genéticas, câncer, problemas reprodutivos, alterações imunes e disfunções neurológicas (Trosko, 2011).

Os canais intercelulares das JCs são formados por dois hemicanais, cada um deles inserido na membrana de uma das células adjacentes (Goodenough e Paul., 2009). Os hemicanais são formados por seis Cxs arranjadas de maneira a formar um poro central, cujo diâmetro total varia entre 1,5 a 2,0 nm (Unwin and Zampighi, 1980). Esses hemicanais são formados na membrana do retículo endoplasmático e exportados para a membrana plasmática, onde se deslocam lateralmente (Salameh et al., 2006).

Os hemicanais podem ser constituídos de apenas um tipo de Cx (homoméricos) ou por tipos diferentes (heteroméricos) (Bruzzone et al., 1996). Todos os hemicanais heteroméricos já escritos constituem-se de Cxs pertencentes a um mesmo grupo. Por exemplo, a Cx43 forma hemicanais heteroméricos com a Cx40 (grupo Alfa), mas não com a Cx32 (grupo Beta) (Segretain e Falk, 2004). Um hemicanal pode conectar-se a outro idêntico, formando canais homotípicos. Canais formados por diferentes hemicanais recebem a denominação de heterotípicos. Entretanto, nem todas as combinações de hemicanais podem originar canais heterotípicos funcionais (Bruzzone et al., 1996; Mese e White, 2007). Por exemplo, hemicanais de Cx26 podem formar canais funcionais associados a hemicanais de Cx32, mas não de Cx40 (Mese e White, 2007).

A comunicação por JCs pode ser regulada de diferentes maneiras, incluindo a abertura e fechamento de canais, alterações de permeabilidade, síntese e degradação de proteínas (Solan e Lampe, 2009; Goodenough e Paul, 2009). Entre os fatores fisiológicos que podem interferir nas propriedades funcionais das JCs estão a diferença de voltagem entre as células, pH intracelular e variações na concentração de cálcio (Bennett et al., 2003; Goodenough e Paul, 2009).

Além disso, as Cxs constituem alvos frequentes de alterações pós-translacionais. As Cxs podem ser fosforiladas por uma grande diversidade de proteínas, o que pode ter consequências variadas como o fechamento de canais ou a retirada de Cxs da membrana celular (Lampe e Lau, 2000; Segretain e Falk, 2004). O conjunto de Cxs que constitui as JCs determina sua suscetibilidade a mecanismos de regulação das JCs e propriedades como a condutância dos canais, a permeabilidade a moléculas relevantes biologicamente e a sensibilidade à voltagem (Goodenough e Paul, 2009; Mese e White, 2007; White et al., 1994).

Figura 1 - Modelo tridimensional de canais de junções comunicantes

A) Junção comunicante, formada por canais intercelulares. Cada um dos canais constitui-se de dois hemicanais. B) Cada hemicanal é formado por seis Cxs, organizadas de modo a formar um poro central. C) Estrutura molecular das Cxs

FONTE: Adaptado de Kandel et al. (2000)

Na membrana plasmática existem hemicanais de Cxs que não formam canais intercelulares e, portanto, não fazem parte das JCs. Esses hemicanais foram observados na membrana de diferentes tipos celulares e considerados por muito tempo apenas precursores estruturais das JCs (Bennett et al., 2003). Atualmente, sabe-se que esses hemicanais permitem a liberação de moléculas para o meio extracelular, participam de funções autócrinas e parácrinas e podem atuar como moléculas de adesão (Bennett et al., 2003; Cotrina et al., 2000; Cotrina e Nedergaard, 2008).

Tabela 1 Conexinas localizadas no sistema nervoso

Grupo	Sinônimo	Isoforma	Localização no sistema nervoso
Alfa	Cx43	alfa 1	Astrócitos (Nagy et al., 2003) Neurônios (Chang et al., 1999)
	Cx37	alfa 4	Neurônios (Chang et al, 1999)
	Cx40	alfa 5	Neurônios (Chang et al., 1999)
	Cx57	alfa 10	Neurônios (Zappalà et al., 2010)
Beta	Cx32	beta 1	Oligodendrócitos (SNC), células de Schwann (SNP) (Nagy et al., 2003)
	Cx26	beta 2	Astrócitos (Nagy et al., 2003)
	Cx30	beta 6	Astrócitos (Nagy et al., 2003)
Delta	Cx36	delta 2	Neurônios (Belluardo et al, 2000)
Gama	Cx45	gama 1	Neurônios (Maxeiner et al., 2003)
	Cx47	gama 2	Oligodendrócitos (Meninchella et al., 2003) Neurônios (Chang et al., 2000)

Cxs expressas pelos principais tipos celulares do sistema nervoso separadas por grupo. Todas as Cxs indicadas foram descritas em humanos, ratos e na galinha.

FONTE: Guedes (2012) Tabela elaborada com base nas referências citadas acima e do banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Os hemicanais apresentam baixa probabilidade de abertura e podem ser ativados por estímulos como a baixa concentração extracelular de cálcio, despolarização da membrana, alterações no pH e fosforilação (Bennett et al., 2003; Spray et al., 2006). Os hemicanais estão associados a mecanismos patológicos e síndromes genéticas relacionadas à mutação de Cxs, como na doença de Charcot-Marie-Tooth (Cx32), displasia ectodermal hidrótica (Cx30) e na surdez hereditária (Cx26) (Abrams et al., 2002). Existem evidências de que, além das Cxs, as Pxs podem também formar hemicanais funcionais (Thompson e MacVicar, 2008).

1.2 CONEXINAS NO SISTEMA NERVOSO

1.2.1 Sistema nervoso adulto

Diferentes Cxs foram encontradas no sistema nervoso maduro de vertebrados, as quais podem formar os canais intercelulares das JCs ou hemicanais funcionais (Bennett et al., 2003; Thompson e MacVicar, 2008) (Tabela 1). O acoplamento via JCs foi identificado entre neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, microglia e células ependimais (Hormuzdi et al., 2004; Nagy et al., 2003; Nagy e Rash, 2004). Tipos celulares diferentes também podem ser conectados via JCs, como neurônios e astrócitos (Alvarez-Maubecin, 2000) e astrócitos e oligodendrócitos (Nagy et al., 2003). Os hemicanais foram descritos principalmente em astrócitos, mas existem evidências de que estejam também presentes em neurônios (Thompson e MacVicar, 2008).

1.2.1.1 Conexinas e comunicação neuronal

Os neurônios conectam-se uns aos outros formando circuitos interligados. A codificação e o processamento de informações nos circuitos neuronais possibilita a interação dos animais com o ambiente, a elaboração de comportamentos adaptativos típicos de uma espécie e os processos cognitivos característicos dos humanos (Araque, 2009; Fuster et al., 2000).

A interação funcional entre os neurônios ocorre por meio de estruturas especializadas denominadas sinapses (Hormuzdi et al., 2004). As sinapses podem ser químicas ou elétricas. A estrutura sináptica envolve um elemento pré e um pós-sináptico, separados por um espaço denominado fenda sináptica (Bennett, 1999). Nas sinapses químicas, de modo geral, a chegada de um potencial de ação no terminal axônico do neurônio pré-sináptico leva à liberação de neurotransmissores. As moléculas de neurotransmissor difundem-se pela fenda sináptica e ligam-se a receptores especializados na membrana da célula pós-sináptica (Allen e Barres, 2009; Hormuzdi et al., 2004).

Esses receptores podem ser canais iônicos dependentes de ligantes, os quais permitem o fluxo de íons através da membrana neuronal (ionotrópicos), ou iniciar respostas bioquímicas intracelulares (metabotrópicos). Os receptores metabotrópicos podem levar indiretamente à abertura de canais iônicos ou gerar respostas mais complexas, como a ativação de fatores de

transcrição (Bennett, 1997). A mudança no fluxo iônico pode causar despolarização ou hiperpolarização na membrana e a formação de potenciais pós-sinápticos excitatórios ou inibitórios, respectivamente. A despolarização pode levar ao disparo de potencial de ação no neurônio pós-sináptico (Bennett, 1997; Hormuzdi et al, 2004).

As sinapses elétricas são formadas por JCs entre neurônios. Nas sinapses elétricas, a corrente iônica pode passar livremente entre as duas células (Bennet, 2003; Goodenough e Paul, 2009). As sinapses elétricas permitem a passagem de estímulos sublimiares e não exclusivamente potenciais de ação. As células acopladas por sinapses elétricas tendem a apresentar potenciais de membrana similares e, sendo assim, existe uma maior probabilidade de disparo sincronizado de potenciais de ação (Bennet, 2003; Dugue et al., 2009).

Durante muito tempo, discutiu-se a natureza da transmissão dos potenciais de ação no sistema nervoso. A identificação da transmissão química na junção neuromuscular levou à conclusão de que a comunicação entre neurônios seria mediada exclusivamente pelas sinapses químicas. Posteriormente, na década de 50, as sinapses elétricas foram demonstradas em invertebrados (Fushiki et al., 2010). Em função disso, as sinapses elétricas passaram a ser consideradas típicas de formas de vida menos complexas (Bennett, 1997).

Essa visão passou a mudar com a observação de sinapses elétricas em diferentes regiões do SNC de mamíferos, incluindo o neocórtex (Galarreta e Hestrin, 1999), retina (Kothmann et al, 2009), tálamo (Hughes et al., 2002), hipocampo (Hamzei-Sichani et al., 2012), bulbo olfatório (Schoppa e Westbrook, 2002), complexo olivar inferior (Hoge et al., 2011) e córtex cerebelar (Dugué et al., 2009).

Atualmente, existe um reconhecimento crescente da importância funcional das sinapses elétricas (Bennett et al., 2004; Hestrin, 2011). As sinapses elétricas parecem ser fundamentais na geração das oscilações em redes neuronais, uma atividade rítmica sincronizada observada em populações de neurônios (Gouwens et al., 2010; Pangratz-Fuehrer e Hestrin, 2011). Essas oscilações estariam relacionadas ao processamento de informação em sistemas motores e em processos cognitivos como a percepção visual, integração multissensorial, atenção e memória (Jensen et al., 2012; Vanrullen e Macdonald, 2012).

Por fim, a existência de transmissão química ou elétrica não é mutuamente exclusiva, como se acreditava inicialmente (Bennett et al., 1999). As sinapses elétricas e químicas coexistem em circuitos ou mesmo em células (Hamzei-Sichani et al., 2012). Além disso,

evidências provenientes de diversos estudos sugerem que esses dois tipos de sinapses interagem funcionalmente (Dugue et al., 2009).

A presença de Cx36 foi observada em sinapses elétricas de diversas áreas do SNC de ratos (Condorelli et al., 2000). Neurônios de muitas regiões do SNC de mamíferos e na retina de outras espécies de vertebrados apresentam Cx36 (Belluardo et al., 2000; Kihara et al., 2009; O'Brien et al., 1996; O'Brien et al., 1998). A Cx36 encontra-se ainda nas células beta do pâncreas, células cromafins da adrenal e em outras células que, assim como o sistema nervoso, apresentam origem ectodérmica (Condorelli et al., 1998). A Cx36 é altamente conservada filogeneticamente. Existe uma grande similaridade entre a sequência de aminoácidos na Cx36 de diferentes espécies de mamíferos e a da galinha (González-Nieto, 2008).

Além da Cx36, foram descritas em neurônios a Cx37 (Chang et al., 1999); Cx40 (Chang et al., 1999), Cx43 (Chang et al., 1999); Cx45 (Maxeiner et al., 2003), Cx47 (Chang et al., 1999) e Cx57 (Zappalá et al., 2010), entre outras. No entanto, neurônios que expressam essas isoformas de Cxs apresentam uma distribuição bastante restrita no SNC (Chang et al., 1999; Zappála et al., 2010). Dessas Cxs, apenas a Cx57 foi detectada exclusivamente em neurônios (Zappála et al., 2010). Além disso, a Cx47 e a Cx26 são expressas preferencialmente por células da glia (Nash et al., 2003).

1.2.1.2 Conexinas e células da glia

As células da glia dividem-se em macroglia e microglia (Wirenfeldt et al., 2011). Os astrócitos e oligodendrócitos constituem a macroglia (Hormuzdi et al., 2004). A microglia consiste em células do sistema imune presentes no SNC (Bennett e Zukin, 2004). A glia é conservada evolutivamente, sendo encontrada já em invertebrados (Allen e Barres, 2009).

Em todas as regiões do SNC, os astrócitos são extensamente acoplados por JCs (Nagy et al., 2004; Orthman-Murphy et al., 2008). Os astrócitos constituem uma população heterogênea de células com múltiplos processos, os quais apresentam dilatações em sua extremidade denominadas pés-terminais (Rouach et al., 2008). Os astrócitos da substância branca ou fibrosos são células complexas com 50 a 60 processos longos e ramificados. Os pés terminais desses astrócitos terminam na superfície do tecido nervoso, em vasos sanguíneos ou livremente entre os axônios. Os astrócitos da substância cinzenta ou protoplasmáticos apresentam muitos processos grossos que circundam neurônios, fazem contato com vasos sanguíneos ou com a superfície (Magistretti e Ransom, 2002; Allen e Barres, 2009). Por fim, astrócitos especializados podem ser encontrados em diferentes regiões do sistema nervoso, como as células de Muller na retina e a glia de Bergmann no cerebelo (Perea e Araque, 2005).

Os astrócitos fornecem suporte estrutural para os neurônios e formam uma espécie de revestimento na superfície do sistema nervoso denominado glia limitans (Feig e Haberly, 2011). Os astrócitos mantêm a homeostase do meio extracelular, removendo os íons K^+ derivados da atividade neuronal (Nagy e Rash, 2000). Além disso, a sinalização produzida em astrócitos aumenta o suprimento sanguíneo para regiões específicas, em resposta ao aumento da atividade neuronal (Allen e Barres, 2009). Os astrócitos convertem glicose em lactato, o qual é exportado para os neurônios e serve como substrato para a produção de ATP. A captação da glicose ocorreria por meio de transportadores localizados nos pés-terminais dos astrócitos (Magistretti e Ransom, 2002). As JCs contribuem para a função homeostática e metabólica dos astrócitos, permitindo a difusão de nutrientes e o tamponamento espacial de metabólitos ou íons K^+ (Strohschein et al., 2011).

Os processos de astrócitos protoplasmáticos envolvem as sinapses químicas. Esses processos apresentam locais de captação de vários neurotransmissores liberados na fenda sináptica (Haydon, 2001). Além disso, especialmente na última década, surgiram evidências de

que os astrócitos participam ativamente do processamento de informação nas sinapses químicas, podendo não só responder à atividade sináptica como também influenciá-la (Araque, 1995; Perea et al., 2009).

As membranas dos astrócitos não formam potenciais de ação ou potenciais pós-sinápticos. Entretanto, os astrócitos apresentam uma forma de atividade elétrica, baseada em aumentos transientes na concentração intracelular de cálcio. Essas alterações na concentração de cálcio podem espalhar-se entre astrócitos vizinhos na forma de ondas e, por isso, denominam-se ondas de cálcio (Haydon, 2001; Perea et al, 2009). As ondas de cálcio estão relacionadas à expressão de Cxs nos astrócitos e ao acoplamento por JCs (Araque, 2009; Cotrina et al., 1998; Leybaert et al., 1998).

Esse aumento de cálcio intracelular pode causar a liberação de substâncias neuroativas, um processo denominado gliotransmissão. Existe uma grande variedade de gliotransmissores, como o glutamato e a adenosina trifosfato (ATP) (Cotrina et al., 1998; Perea e Araque, 2010). Os gliotransmissores influenciam a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica, por meio da ativação de receptores localizados nos neurônios pré e pós-sinápticos (Paixão e Klein, 2010). Pelo menos em parte, a liberação de substâncias neuroativas pelos astrócitos ocorre através de hemicanais de Cxs (Ye et al, 2003). Os processos de astrócitos expressam uma grande variedade de canais iônicos e receptores para neurotransmissores (Agulhon et al, 2008).

A Cx26, Cx30 e Cx43 foram descritas em astrócitos (Nagy et al., 2003). A Cx30 foi identificada em astrócitos na substância cinzenta de todas as regiões do encéfalo e da medula espinhal, sendo capaz de formar JCs e hemicanais (Nagy et al., 2004; Thompson e MacVicar, 2008). A Cx26 foi descrita em astrócitos nas regiões pial e subependimal. Entretanto, não há consenso sobre a localização dessa Cx em astrócitos ou sua importância funcional (Mercier e Hatton, 2001).

A Cx43 foi a primeira Cx a ser clonada e sequenciada (Cruciani and Mikalsen, 2007). Astrócitos expressando Cx43 encontram-se nas substâncias cinzenta e branca de todas as regiões do SNC (Nagy e Rash, 2000). A Cx43 forma JCs e hemicanais, os quais se associam a funções como a liberação de glutamato e ATP (Bennett et al., 2003). Em humanos, a mutação do gene que codifica a Cx43 causa a síndrome conhecida por ODDD (oculo-dentodigital dysplasia). A ODDD consiste em uma doença rara e autossômica dominante, com variabilidade fenotípica e que pode envolver manifestações neurológicas (Wiencken-Barger et al., 2007).

Figura 2 - Interação entre neurônios e células da glia no sistema nervoso central

A) Principais células da glia do SNC e sua relação com neurônios. B) Astrócitos envolvem as sinapses químicas e interagem bidirecionalmente com os neurônios. A liberação de neurotransmissor no terminal pré-sináptico gera elevação do cálcio intracelular nos astrócitos, o que causa a liberação de gliotransmissores. Esses gliotransmissores modulam a atividade neuronal e transmissão sináptica

FONTE: Adaptado de Allen e Barres (2009)

Os oligodendrócitos são menores que os astrócitos e estendem muitos processos. Esses processos enrolam-se em uma região do axônio e produzem uma membrana rica em lipídeos denominada mielina (Aggarwal et al., 2011; Nave, 2010). No mesmo axônio, segmentos adjacentes de mielina são formados por diferentes oligodendrócitos (Baumann e Pham-Dinh, 2001). A mielina fornece isolamento elétrico ao axônio aumentando a sua velocidade de condução (Allen e Barres, 2009). Doenças desmielinizantes como a esclerose múltipla resultam em grandes déficits funcionais (Aggarwal et al., 2011).

Existem ainda oligodendrócitos que funcionam como células-satélite de neurônios e que não produzem bainhas de mielina (Baumann e Pham-Dinh, 2001). Os oligodendrócitos que não produzem mielina estabelecem raras JCs com outros oligodendrócitos. As JCs entre oligodendrócitos mielinizantes são mais comuns (Sutor e Hagerty, 2005). Além disso, camadas sucessivas de mielina são conectadas por JCs (Kamasawa et al., 2005).

As JCs entre astrócitos e oligodendrócitos são frequentes (Nagy e Rash, 2000). As JCs entre esses dois tipos de células da glia atuam no tamponamento de íons K^+ e permitiria a propagação de ondas de cálcio entre elas (Parys et al., 2010). Os oligodendrócitos expressam Cx29, Cx32 e Cx47 (Magnotti et al., 2011a; Nagy et al., 2003). A Cx47 foi observada no encéfalo e na medula espinhal (Teubner et al., 2001). A Cx29 foi observada no encéfalo e no SNP e não participaria da formação de JCs (Altevogt et al., 2002; Nagy et al., 2004). A Cx32 é a principal Cx das células de Schwann, as quais produzem mielina no sistema nervoso periférico (SNP), mas também se encontra no SNC (Nagy e Rash, 2000; Nagy et al., 2004).

1.2.2 Desenvolvimento do sistema nervoso

Durante o desenvolvimento do SNC, as células indiferenciadas das zonas germinativas originam células especializadas, com fenótipos distintos e propriedades bioquímicas específicas. Gradativamente, os circuitos neuronais altamente organizados típicos do tecido nervoso maduro são constituídos. As diferentes células da glia assumem suas posições e passam a interagir umas com as outras e com os neurônios (Goldowitz, 1998; Rakic, 2006; Rakic, 2007; Sutor e Hagerty, 2005).

1.2.2.1 Etapas iniciais do desenvolvimento

Nas fases iniciais do desenvolvimento, ocorre uma intensa proliferação mitótica de células situadas em áreas germinativas, principalmente no neuroepitélio das zonas ventriculares (Goldowitz, 1998). Durante a mitose, os núcleos das células neuroepiteliais movem-se de cima para baixo, um fenômeno denominado migração nuclear intercinética (Elias e Kriegstein, 2008).

As células neuroepiteliais podem gerar uma grande diversidade de tipos celulares. Inicialmente, as células das áreas germinativas passam por uma série de divisões simétricas, em que as duas células-filhas são idênticas à célula-mãe. Consequentemente, ocorre um aumento na população celular dessas regiões (Gotz e Huttner, 2005).

A geração de diferentes tipos celulares ocorre por meio de divisões mitóticas assimétricas. Nesse tipo de divisão, apenas uma das células-filhas é igual à célula-mãe. A outra célula gerada na mitose apresenta um maior grau de especialização, sendo capaz de originar uma menor diversidade de tipos celulares. Esse mecanismo conservado filogeneticamente produz células precursoras com diferenças quanto à capacidade proliferativa e ao destino de suas células-filhas (Dehay e Kennedy, 2007). Após certo número de divisões, as células precursoras de neurônios saem do ciclo celular e migram para outras regiões do SNC, onde passam pela sua fase final de diferenciação (Nadarajah e Parnavelas, 2002).

Na fase proliferativa, as células são intensamente acopladas (Nadarajah et al. 1998). As JCs permitiriam a sincronização metabólica entre as células em proliferação, permitindo a passagem de íons e moléculas relacionados a diversas formas de sinalização e possibilitando a coordenação da expressão gênica (Duval et al., 2002).

O termo diferenciação refere-se ao processo pelo qual as células tornam-se gradativamente mais especializadas até assumirem as características morfológicas, bioquímicas e funcionais do tecido maduro (Parnavelas, 2002; Wonders e Anderson, 2006). A geração de diferentes tipos celulares parece depender de um programa celular intrínseco, o qual é influenciado por fatores externos (Dehay e Kennedy, 2007). Além disso, um equilíbrio entre proliferação e morte celular determinaria o número de células diferenciadas e seria importante no estabelecimento da morfologia tecidual. Nas fases iniciais do desenvolvimento, as células precursoras e os neurônios jovens podem ser eliminados por um processo de morte celular programada (de La Rosa e de Pablo, 2000).

As células da glia radial constituem um importante grupo de precursores, gerado na zona ventricular a partir das células neuroepiteliais (Farkas e Hutner, 2008). A glia radial aparece transitoriamente na maior parte das regiões encefálicas e exibe tanto características de astrócitos quanto neuroepiteliais. Os processos da glia radial estendem-se da zona ventricular até a superfície do tecido e fornecem suporte para a migração de neurônios e outros tipos celulares (Malatesta et al., 2008; Noctor et al., 2008). A glia radial apresenta hemicanais de Cxs que podem atuar como moléculas de adesão (Elias et al., 2007).

As células da glia radial originam astrócitos, oligodendrócitos ou neurônios. Entretanto, na maioria das vezes, cada célula da glia radial forma apenas um único tipo celular (Farkas e Huttner, 2008; Gotz e Hutner, 2005). Acredita-se que a maioria dos neurônios do encéfalo deriva-se direta ou indiretamente da glia radial (Kriegstein e Gotz, 2003). Entretanto, os neurônios podem originar-se também de outros tipos de precursores celulares. De fato, o processo de formação de neurônios ou neurogênese inicia-se muito cedo, antes mesmo do aparecimento das células da glia radial (Farkas e Huttner, 2008). A formação de células da glia ou gliogênese acontece mais tarde durante o desenvolvimento (Farkas e Huttner, 2008; Gotz e Hutner, 2005).

Por muito tempo, a neurogênese foi considerada nos vertebrados um fenômeno restrito ao desenvolvimento. Hoje se sabe que neurônios podem ser produzidos no SNC adulto de diversas espécies. Nos mamíferos, existem duas áreas onde a neurogênese foi confirmada: as células-tronco localizadas na parede dos ventrículos laterais e no giro denteado do hipocampo (Amrein et al., 2011). Ainda existe controvérsia sobre a neurogênese em outras áreas. A neurogênese no encéfalo adulto em peixes, anfíbios e aves é menos restrita e pode ser observada em diversas regiões (Barnea e Pravosudov, 2011; Bonfanti e Peretto, 2011). As células-tronco em animais adultos apresentam características de astrócitos e são similares às células da glia radial do período de desenvolvimento (Malatesta et al., 2008).

Durante o desenvolvimento, existem dois modos principais de migração celular: tangencial e radial. Na migração tangencial, as células deslocam-se paralelamente à superfície (Marin e Rubenstein, 2003). Quando a migração ocorre com uma orientação perpendicular à superfície, recebe o nome de radial. Esse tipo de migração pode ou não estar associado aos processos da glia radial (Kriegstein e Noctor, 2004; Rakic, 1971).

Quando as células chegam à sua posição final, começa a última fase da diferenciação celular. As células adquirem nesse momento as características que as definem morfológica e funcionalmente no SNC maduro. Nessa etapa do desenvolvimento, ocorre a formação das árvores dendríticas dos neurônios (Cline, 2001), a extensão de seus axônios em direção aos alvos apropriados (Kalil et al., 2000), a maturação da excitabilidade elétrica, a especificação de neurotransmissores e a sinaptogênese (Spitzer, 2006).

1.2.2.2 Formação de circuitos neuronais

A constituição dos circuitos neuronais envolve um balanço entre formação e eliminação de sinapses (Shatz et al., 1990), sobrevivência e morte celular (de La Rosa e de Pablo, 2000) e a interação entre sinapses elétricas e químicas (Park et al, 2011).

Para que ocorra o estabelecimento de contatos sinápticos, os axônios precisam atingir seus alvos. As pontas dos axônios, os cones de crescimento, guiam o crescimento axônico em resposta a moléculas presentes no meio extracelular. Essas pistas do ambiente ativam receptores que causam respostas do citoesqueleto, gerando mobilidade e crescimento (Kalil et al., 2000). Quando os axônios atingem seus alvos, moléculas de adesão induzem a formação de sinapses. Nesse momento, ocorre a formação de domínios especializados para a liberação de neurotransmissores; fatores anterógrados e retrógrados começam a ser secretados e formam-se os receptores pós-sinápticos (Melom e Littleton, 2011).

Cada neurônio faz contato com diferentes células pela ramificação de seu axônio. Entretanto, nem todos esses ramos são mantidos nos circuitos maduros e muitas das sinapses formadas durante o desenvolvimento acabam sendo eliminadas (Gibson e Ma, 2011). A atividade sináptica atua na modelagem e manutenção dos circuitos neuronais (Melom e Littleton, 2011). Além disso, as células da glia produzem fatores que induzem ou inibem a sinaptogênese (Margeta e Shen, 2010).

Os neurotransmissores liberados pelo terminal pré-sináptico são importantes na manutenção das sinapses (Mattson, 2008). As sinapses glutamatérgicas são as primeiras a aparecerem no SNC em desenvolvimento (Okada et al, 2003). A liberação de glutamato nas sinapses nascentes induz a produção de fatores de crescimento nos neurônios pós-sinápticos, incluindo o BDNF (brain-derived neurotrophic factor) e o NGF (nerve growth factor). Os fatores

neurotróficos liberados pela célula pós-sináptica ativam receptores no neurônio pré-sináptico. Como resultado, ocorre a regulação de genes que codificam proteínas críticas para a sobrevivência celular (Martins et al., 2005; Zafra et al., 1991). Durante o desenvolvimento, a morte neuronal pode ser deflagrada pelo bloqueio transiente de receptores ionotrópicos de glutamato do tipo NMDA (N-methyl-d-aspartate) (Ikonomidou, 2001).

A atividade sináptica induz ainda a formação e estabilização da árvore dendrítica. Tipicamente, os neurônios formam primeiro um dendrito primário, do qual se ramificam os dendritos secundários. Por último, formam-se os dendritos terciários. O padrão final de arborização se estabelece não apenas pela adição de novos ramos, mas pela retração e eliminação daqueles já formados (Emoto et al., 2011). Os neurotransmissores liberados pela célula pré-sináptica podem ser importante fator na formação da árvore dendrítica. Por exemplo, o glutamato pode estimular a produção de fatores neurotróficos como o BDNF ou por mecanismos envolvendo o influxo de cálcio na célula (Cline, 2001; Mattson, 2008).

Antes da formação das sinapses químicas, os precursores neuronais e neurônios imaturos são extensamente acoplados por JCs. O acoplamento diminui com o surgimento das sinapses químicas. Acredita-se que a comunicação por JCs durante o desenvolvimento relaciona-se à formação dos circuitos neuronais. Grupos de células funcionalmente relacionados no adulto seriam acoplados durante o desenvolvimento por sinapses elétricas (Kandler e Katz, 1998; Sutor e Hagerty, 2005).

A atividade elétrica no SNC parece ser um importante mecanismo na formação de circuitos neuronais, surgindo antes mesmo da formação de sinapses químicas. Nesse caso, a atividade elétrica refere-se principalmente a alterações da concentração intracelular de cálcio ou à propagação de ondas de cálcio mediadas por JCs (Kandler e Katz, 1998), semelhante ao que ocorre em astrócitos. Esse tipo de atividade foi observado no córtex de mamíferos, na retina de aves e no tubo neural de anfíbios e ocorre em todos os estágios de desenvolvimento, inclusive na fase proliferativa e durante a migração (Elias et al., 2010; Elias e Kriegstein, 2008).

As ondas de cálcio parecem ser importantes na expressão de neurotransmissores e canais iônicos, na extensão de neuritos e formação de cones de crescimento (Sutor e Hagerty, 2005; Spitzer, 2006). A ausência das ondas de cálcio altera, por exemplo, a distribuição das fibras das células ganglionares da retina em camadas específicas no núcleo geniculado lateral e a formação de colunas de dominância e orientação no córtex visual primário (Katz e Shatz, 1996).

No sistema nervoso completamente diferenciado, a comunicação entre neurônios por sinapses químicas passa ser o mecanismo mais comum (Bruzzone e Dermietzel, 2006). Por fim, após o desenvolvimento da transmissão sináptica química, a atividade elétrica proveniente da experiência sensorial possibilita o refinamento sináptico e a maturação dos circuitos neuronais. Esse processo envolve mudanças da atividade sináptica de neurônios e de padrões de conectividade (Tian, 2004).

1.2.2.3 Expressão de conexinas no desenvolvimento

Durante o desenvolvimento, as Cxs formam canais intercelulares, hemicanais que liberam neurotransmissores ou atuam como moléculas de adesão (Bruzzone e Dermietzel, 2006; Elias et al., 2007). Em progenitores neurais, ocorre a modulação da expressão de Cxs de acordo com a fase do ciclo celular, o que sugere a participação de Cxs na regulação de mecanismos de proliferação (Bittman e LoTurco, 1999; Miragall et al., 1997).

Diferentes isoformas de Cxs foram detectadas no SNC em desenvolvimento. Entre elas, a Cx26, Cx45, Cx36 e Cx43 são bastante expressas (Montoro e Yuste, 2004). A expressão de Cxs distintas varia de forma específica ao longo do amadurecimento do tecido. Cxs que não estavam presentes passam a ser detectadas, enquanto outras passam a ser menos expressas ou desaparecem (Belluardo et al, 2000; Nadarajah e Parnavelas, 1999; Rozental et al., 2000).

Sendo assim, Cxs específicas parecem ser importantes em diferentes momentos do processo de desenvolvimento, independentemente da quantidade total de acoplamento celular. Por exemplo, a Cx26 é altamente expressa no período embrionário e início do período pós-natal, mas sua expressão diminui com o amadurecimento do tecido (Nadarajah e Parnavelas, 1999). Ao contrário a Cx32 é expressa em estágios tardios de desenvolvimento, apenas em células completamente diferenciadas (Peinado et al., 1993).

A Cx43 e a Cx36 são observadas desde o início da histogênese do sistema nervoso (Montoro e Yuste, 2004; Rosental et al., 2000). O padrão de expressão dessas Cxs ao longo do desenvolvimento varia com a região. Entretanto, na maioria das áreas do SNC já estudadas, tanto a Cx43 quanto a Cx36 apresentam um aumento de expressão ao longo do período embrionário e início do período pós-natal (Aberg et al., 1999; Belluardo et al., 2000).

A expressão da Cx43 pode ser detectada nas zonas ventriculares tanto em mamíferos quanto na galinha. As células da região ventricular que apresentam Cx43 no início do desenvolvimento continuam a expressar essa Cx quando se diferenciam em astrócitos (Rozental et al., 2000). Além disso, a Cx43 foi associada ao processo de migração neuronal (Elias et al., 2007; Santiago et al., 2010). A Cx36 foi descrita principalmente nas JCs entre neurônios imaturos em diferentes regiões do SNC e associada com a formação de circuitos neuronais (Bruzzone e Dermietzel, 2006).

1.3 CEREBELO

O cerebelo situa-se na parte posterior do encéfalo, dorsalmente ao tronco encefálico (Altmann e Bayer, 1997). O cerebelo é considerado tradicionalmente uma estrutura do sistema motor, associada ao controle do movimento e à aprendizagem motora (Ito, 2000). Disfunções cerebelares causam sintomas motores como alteração do equilíbrio, ataxia, dismetria, disartria e distúrbios oculomotores (Koeppen, 2005; Stoodley e Schmahmann, 2010).

Além disso, diversos estudos mostram a participação do cerebelo em tarefas envolvendo processamento sensorial (Gao et al., 1996), mecanismos atencionais (Pope e Miall, 2012), memória operacional (Desmond et al., 1997), criação de imagens mentais (Ryding et al., 1993) e conteúdo afetivo (Gundel et al., 2003). A síndrome cerebelar afetivo-cognitiva ocorre em pacientes com dano cerebelar e envolve déficits executivos, visuo-espaciais, linguísticos e afetivos (Schmahmann e Sherman, 1998).

Recentemente, o cerebelo passou a ser relacionado também a patologias psiquiátricas, como a esquizofrenia (Sandyk et al., 1991; Varambally et al., 2006), distúrbios do humor e ansiedade (Nestler e Carlezon, 2006; Hoppenbrouwers et al., 2008), transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) (Charmberlain, 2007) e distúrbios do espectro do autismo (Dicicco-Bloom, 2006).

Portanto, o cerebelo parece apresentar importantes funções não apenas no sistema motor, mas em processos cognitivos e no controle das emoções. Entretanto, apesar do conhecimento sobre a anatomia cerebelar, não existe consenso a respeito de como o processamento de informações nos circuitos cerebelares possibilita que o cerebelo exerça as funções as quais se associa.

1.3.1 Anatomia do cerebelo

O cerebelo apresenta um córtex de substância cinzenta com três camadas em torno de uma região central de substância branca (Altmann e Bayer, 1997). O cerebelo conecta-se com uma grande variedade de áreas da medula espinhal, tronco encefálico e córtex cerebral, cujas projeções são organizadas topograficamente no córtex cerebelar (Stoodley e Schmahmann, 2010). O córtex cerebelar recebe dois sistemas de fibras aferentes: as fibras musgosas e as fibras trepadeiras (Ito, 2006).

As fibras musgosas originam-se de diferentes segmentos da medula espinhal e do córtex cerebral, entre outros (Altmann e Bayer, 1997; Stoodley e Schmahmann, 2010). As fibras trepadeiras são provenientes da oliva inferior, uma estrutura filogeneticamente antiga, identificada já em anfíbios e bem desenvolvida em aves (Altmann e Bayer, 1997). A oliva inferior recebe projeções ascendentes da medula espinhal e estruturas como o núcleo sensório trigeminal, núcleos vestibulares, núcleos da coluna dorsal e núcleo do trato solitário. Além disso, a oliva inferior recebe fibras descendentes provenientes do núcleo rubro e córtex cerebral (Altmann e Bayer, 1997; Welsh e Llinás, 1997).

O cerebelo apresenta em sua superfície lâminas finas transversais denominadas folhas e numerosas fissuras (Altmann e Bayer, 1997). Dez lóbulos são reconhecidos em aves, em homologia aos lóbulos de I-X do cerebelo de mamíferos. Na galinha, os lóbulos I-V compreendem o lobo anterior, separado do lobo posterior (lóbulos VI-IX) pela fissura primária. A fissura pósterio-lateral separa o lóbulo X (nodulus) do lobo posterior (Marzban, 2010) (Figura 3).

A substância branca penetra entre as folhas cerebelares, uma área considerada por alguns autores a camada medular do córtex cerebelar (Altmann e Bayer, 1997). Na substância branca, encontram-se fibras mielinizadas provenientes de outras regiões do SNC e as projeções de saída do córtex cerebelar (Balsters et al., 2010). As fibras eferentes do córtex cerebelar seguem principalmente para os núcleos cerebelares profundos, estruturas encontradas no interior da substância branca do cerebelo. Dos núcleos cerebelares profundos saem as projeções cerebelares para outras áreas do SNC (Freewman e Steinmetz, 2011; Harbas 2010). As fibras musgosas e as fibras trepadeiras enviam colaterais para os núcleos cerebelares quando entram no cerebelo (Altmann e Bayer, 1997; Pijpers et al., 2006)

Os circuitos formados pelos principais tipos celulares do córtex cerebelar repetem-se ao longo de todo o cerebelo, formando um padrão de conexões altamente organizado e uniforme (Altmann e Bayer, 1997; Ito, 2006). Os circuitos cerebelares são bastante conservados filogeneticamente e existe uma grande homologia entre a arquitetura do córtex cerebelar de mamíferos e aves (Altmann e Bayer, 1997; Marzban, 2010).

Figura 3 - Vista lateral do cerebelo de galinha

Representação do cerebelo de galinha mostrando as fissuras que delimitam os lobos cerebelares. Os lóbulos são numerados de I a X (de rostral para caudal). Siglas: pcf (fissura pré-central), PF (fissura primária), fissura pré-piramidal (PRF), fissura secundária (sf), fissura póstero-lateral (plf). Escala: 1mm
 FONTE: Adaptado de Marzban et al.(2010)

A camada do córtex cerebelar situada na superfície do cerebelo denomina-se camada molecular (ML, molecular layer). Em seguida, situa-se a camada de células de Purkinje (PCL, Purkinje cell layer), onde se encontram as fibras eferentes do córtex cerebelar. A camada granular (GL, granular layer) situa-se logo abaixo da PCL e constitui a região de entrada de projeções no córtex cerebelar (Altmann e Bayer; 1996; Ito, 2006). Segue uma breve descrição dos principais tipos celulares do córtex cerebelar.

1.3.1.1 Camada Molecular

A ML apresenta dois tipos de interneurônios inibitórios GABAérgicos, as células em cesto e as células estreladas. O corpo celular das células em cesto situa-se na metade ou terço inferior da ML, enquanto as células estreladas estão localizadas principalmente na parte superior dessa camada (Altmann e Bayer, 1997; Dizon e Khodakhah, 2011).

Os axônios das células estreladas terminam dentro da ML e formam sinapses com dendritos das células de Purkinje da PCL (Kenyon, 1997). O axônio das células em cesto originam ramos paralelos à superfície ou descendentes (Weisheit et al., 2003). Os ramos descendentes formam colaterais que envolvem o corpo celular das células de Purkinje e a porção inicial de seu axônio (Altmann e Bayer, 1997). Na ML, localizam-se ainda processos de células cujos corpos celulares estão localizados em outras camadas do córtex cerebelar (Galliano et al., 2010; Dizon e Khodakhah, 2011).

As células em cesto e as células estreladas recebem aferências excitatórias das fibras paralelas, axônios das células granulares da GL (Weisheit et al., 2003). Além disso, as células em cesto recebem uma forte influência inibitória das células de Purkinje (Kenyon, 1997). Sinapses elétricas foram descritas entre células em cesto e estreladas no córtex de mamíferos (Sotelo e Llinás, 1972). Em ratos, essas sinapses elétricas são provavelmente constituídas de Cx36 e Cx45 (Van Der Giessen et al., 2006).

1.3.1.2 Camada de células de Purkinje

As células de Purkinje apresentam grandes corpos celulares em forma de pêra, que formam uma fileira na PCL, e uma extensa árvore dendrítica situada na ML (Altmann e Bayer, 1997). Usualmente apenas um dendrito espesso e variável em comprimento origina-se do corpo celular das células de Purkinje. Desse dendrito primário partem os dendritos secundários, que podem ser espessos ou finos. Os dendritos terciários ramificam-se dos dendritos secundários e apresentam espinhos dendríticos (Tanaka, 2009).

As células de Purkinje apresentam um único axônio que se orienta transversalmente na GL e depois se dirige para a substância branca. Antes de sair do córtex cerebelar, esse axônio emite ramos colaterais que terminam acima ou abaixo da PCL. Esses colaterais conectam outras

células de Purkinje e, possivelmente, outros tipos celulares (Altmann e Bayer, 1997). Os axônios das células de Purkinje dirigem-se em sua grande maioria aos núcleos profundos. Apenas uma pequena parte deles projeta-se para os núcleos vestibulares (Ito, 2006). As células de Purkinje liberam o neurotransmissor GABA e inibem suas células-alvo (Person e Raman, 2011).

As células de Purkinje recebem projeções excitatórias das fibras trepadeiras e das fibras paralelas. As fibras trepadeiras formam sinapses excitatórias nos dendritos primários e secundários das células de Purkinje. As fibras paralelas realizam contatos sinápticos com os espinhos dos dendritos terciários (Altmann e Bayer, 1997). Além disso, as células de Purkinje recebem aferências inibitórias dos interneurônios da ML (Barmack e Yakhnitsa, 2008).

Entre os corpos celulares das células de Purkinje e um pouco abaixo deles, localizam-se os corpos celulares das células da glia de Bergmann, uma forma especializada de astrócito (Altmann e Bayer, 1997; Perea e Araque, 2005). As células da glia de Bergmann são muito mais numerosas que as células de Purkinje e envolvem as sinapses da ML (Hoogland e Kuhn, 2010).

Cada célula da glia de Bergmann tem até cinco processos principais ou fibras. As fibras da glia de Bergmann orientam-se radialmente na ML e terminam na superfície cerebelar. Essas fibras emitem ramos laterais na ML, os quais correspondem a 90% da área de membrana total da glia de Bergmann (Grosche et al., 1999). Pelos menos em mamíferos, os processos da glia de Bergmann são conectados por JCs e apresentam Cx43 (Tanaka et al., 2008).

Uma parte desses ramos laterais são curtos, lamelares ou alongados. Outros ramos laterais são muito mais longos, frequentemente apresentando um padrão complexo de ramificação. Muitos ramos laterais originam-se de processos finos que partem das fibras com uma orientação mais ou menos ortogonal (Grosche et al., 1999; Hoogland e Kuhn, 2010). As menores ramificações formam unidades estruturais repetitivas e recebem o nome de microdomínios gliais. Esses microdomínios consistem em processos finos com uma espécie de cabeça arredondada e estruturalmente complexa. Os microdomínios envolvem sinapses entre fibras paralelas e espinhos dendríticos das células de Purkinje (Grosche et al., 1999). Na Figura 4 estão representadas as camadas do córtex cerebelar. Além disso, pode ser vistos os diferentes tipos de astrócitos cerebelares e a relação entre glia de Bergmann e células de Purkinje.

1.3.1.3 Camada Granular

Nessa camada, encontram-se as numerosas células granulares. As células granulares são neurônios pequenos, de citoplasma escasso e núcleos que aparecem fortemente marcados em diversas preparações histológicas (Altmann e Bayer, 1997). Cada célula granular apresenta de três a cinco dendritos que terminam em forma de garra e um axônio único que ascende em direção à superfície do cerebelo.

Na ML, os axônios das células granulares bifurcam-se e assumem uma orientação paralela à superfície (Altmann e Bayer, 1997; Yamazaki e Tanaka, 2009). A partir daí, os axônios das células granulares recebem o nome de fibras paralelas. As fibras paralelas são glutamatérgicas e apresentam varicosidades em toda a sua extensão. Nessas dilatações as fibras paralelas formam sinapses en passant, com as células de Purkinje e outros tipos celulares cujos dendritos encontram-se na ML (Altmann e Bayer, 1996).

Figura 4 – Camadas do córtex cerebelar e astrócitos cerebelares

(A) Vista parassagital do cerebelo de camundongo. (B) Corpos celulares de células de Purkinje e de Bergmann localizados na camada de células de Purkinje e cujos processos estendem-se na camada molecular. Na camada granular e na substância branca podem ser vistos, respectivamente, astrócitos do tipo protoplasmáticos e fibrosos. Abreviações: wm, Substância branca; ml, camada molecular; PCI, camadas de células de Purkinje; gcl, camada de células granulares; DCN, núcleos cerebelares profundos; AC, astrócitos; BGC, células da glia de Bergmann
FONTE: Adaptado de Tanaka et al (2008)

Figura 5 – Principais tipos celulares do córtex cerebelar

A) Camadas do córtex cerebelar e principais tipos de neurônios do córtex cerebelar. Na camada molecular encontram-se as células em cesto e células estreladas. Na camada granular estão as células granulares e células de Golgi. Entre a camada granular e a camada molecular, encontram-se a camada das células de Purkinje. B) Sistemas aferentes do cerebelo. As células musgosas chegam às células granulares, cujos axônios constituem as fibras paralelas. As fibras paralelas formam sinapses com as células de Purkinje. As fibras trepadeiras conectam-se diretamente às células de Purkinje

FONTE: Adaptada de Kandel et al. (2000)

As células de Golgi constituem outro importante tipo celular da GL. Essas células estão presentes em toda a GL, embora sejam mais frequentes na proximidade das células de Purkinje. Os corpos celulares das células de Golgi podem ser tão grandes quanto os das células de Purkinje, apresentando uma forma arredondada ou poligonal (Geurts, 2003). As células de Golgi possuem um exuberante plexo axonal que permanece na GL e dendritos que se orientam em todas as direções (Galiano, 2010). Os dendritos apicais orientam-se em direção à superfície, enquanto os dendritos basolaterais direcionam-se para o interior da GL. Os dendritos apicais das células nas regiões superiores da GL localizam-se na ML (Altmann e Bayer, 1997).

As principais aferências das células de Golgi são as fibras paralelas e as fibras musgosas. As fibras paralelas formam sinapses com os dendritos apicais das células de Golgi na ML. As fibras musgosas conectam-se ao corpo celular e dendritos basais das células de Golgi (Heine et al., 2010). Os principais tipos de neurônios do córtex cerebelar, suas camadas e principais sistemas aferentes estão representados na Figura 5.

As células de Golgi comunicam-se umas com as outras unicamente por sinapses elétricas (Dugué et al., 2009). A Cx36 foi descrita nos dendritos das células de Golgi de ratos (Vervaeke et al., 2010). Astrócitos protoplasmáticos podem ser observados em toda a extensão da GL (Figura 4). Em ratos, a Cx43 e a Cx30 foram identificadas nessas células (Köster-Patzlaff et al., 2008).

Entre os núcleos da GL, encontram-se regiões encapsuladas por processos de astrócitos denominadas glomérulos. Os glomérulos contêm dezenas de dendritos de células granulares, que recebem os terminais axônicos excitatórios das fibras musgosas. Também nos glomérulos, as células granulares recebem aferências inibitórias das células de Golgi (Altmann e Bayer, 1997; Ito, 2006). As células de Golgi conectam as regiões mais distais dos dendritos das células granulares, aonde também chegam os terminais excitatórios das fibras musgosas (Altmann e Bayer, 1997).

1.3.2 Histogênese do córtex cerebelar

As células do cerebelo originam-se do neuroepitélio do IV ventrículo e de uma região mais caudal denominada lábio rômico (Goldowitz e Hamre, 1998). Os precursores das células de Purkinje, células dos núcleos profundos e interneurônios da GL são provenientes da zona ventricular (Altmann e Bayer, 1997). Células originadas no lábio rômico migram tangencialmente pela superfície do cerebelo primitivo e formam uma camada germinativa externa (EGL, external germinal layer). Da EGL originam-se as células granulares (Mecha et al., 2010).

Os interneurônios da ML são gerados em duas fases. Primeiramente, as células precursoras saem da zona germinativa do IV ventrículo e migram para a substância branca, onde continuam a se dividir. Da substância branca, os precursores das células em cesto e células

estreladas migram para a ML, mas pouco se conhece sobre seus mecanismos de migração (Goldowitz e Hamre, 1998; Milosevic e Goldman, 2004).

As primeiras células a deixarem a zona ventricular são os precursores dos neurônios dos núcleos profundos, que se estabelecem na substância branca do córtex cerebelar. Logo depois, as células que se dirigem para o lábio rômboico e os precursores das células de Purkinje deixam a zona ventricular (Goldowitz e Hamre, 1998; Mecha, 2010). Durante o período de migração, grupos de células de Purkinje formam faixas longitudinais, caracterizadas por marcadores específicos e provavelmente relacionadas à estruturação do cerebelo (Lin e Cepko, 1998).

Os precursores das células de Purkinje formam gradualmente uma estrutura plana em torno da qual se organizam as camadas do córtex cerebelar (Feirabend, 1990; Goldowitz e Hamre, 1998). No cerebelo de galinha, por volta do quarto dia de desenvolvimento embrionário (E4), a região onde se formará o cerebelo pode ser vista como um espessamento do neuroepitélio ventricular. No fim de E5, a EGL já pode ser vista na superfície cerebelar. Em E6, os precursores das células de Golgi surgem na zona ventricular (Feirabend, 1990; Goldowitz e Hamre, 1998).

Células precursoras gliais parecem migrar da zona germinativa do ventrículo para outras regiões do cerebelo (Goldowitz e Hamre, 1998). Em E10, os fatores de transcrição Sox8 e Sox9 encontram-se em células espalhadas por todo o córtex cerebelar (Kordes et al., 2005). O Sox8 marca precursores gliais no cerebelo em desenvolvimento. O Sox9 encontra-se em células precursoras gliais das zonas ventriculares e na glia radial em diversas regiões do SNC (Cheng et al., 2001; Stolt et al., 2003). Por volta de E13, o Sox9 concentra-se na proximidade de células de Purkinje, provavelmente localizado em células da glia de Bergmann (Kordes et al., 2005). As fibras da glia de Bergmann imaturas são finas e não apresentam ramificações. Gradualmente, os ramos laterais são formados e as sinapses da ML são envolvidas por eles (Grosche et al., 2002).

Em E10, o córtex cerebelar de galinha constitui-se de duas camadas, a ICCL (internal cortical layer) e a EGL. Na ICCL, encontram-se principalmente células de Purkinje e precursores de células gliais (Kordes et al., 2005). Em E12, as células de Purkinje começam a formar as primeiras sinapses do córtex cerebelar (Sepúlveda, 2005). Nesse estágio, a camada granular interna (IGL, internal granular layer) começa a se formar na região inferior da ICCL. A IGL constituirá a GL do adulto e forma-se basicamente de células granulares que migram da EGL. Em E14, a IGL encontra-se claramente separada da ICCL. Gradativamente, a ICCL deixa de ser

distinguível, a IGL aumenta em espessura e incorpora a região das células de Purkinje (Altmann e Bayer, 1997; Feirabend, 1990).

A EGL apresenta atividade proliferativa no período de E8 a E15. Com o aumento do número de células, ocorre uma expansão da EGL (Goldowitz e Hamre, 1998; Luckner et al, 2001). Gradualmente, os precursores de células granulares da EGL saem do ciclo celular e acumulam-se na região interna dessa camada, onde migram tangencialmente. Da região inferior da EGL, as células granulares iniciam um processo de migração radial na ML primitiva e IGL até alcançarem sua posição final. No percurso da EGL para a IGL, as células granulares passam por diversas mudanças morfológicas e deixam para trás os processos que formarão as fibras paralelas (Luckner et al, 2001; Sepúlveda, 2005).

A ML primitiva encontra-se entre a EGL e as células de Purkinje, começando a ser facilmente distinguível por volta de E16 (Sepúlveda, 2005). A ML forma-se pelo acúmulo de processos, como fibras paralelas e dendritos das células de Purkinje (Altmann e Bayer, 1997). Pelo menos em parte, as células granulares migram na ML em associação às fibras da glia de Bergmann, a glia radial do cerebelo (Altmann e Bayer, 1997; Mecha et al., 2010).

A proliferação da EGL e subsequente migração das células pós-mitóticas resultam em um grande crescimento do cerebelo e na sua transformação anatômica. Gradualmente, a estrutura lisa e curvada do cerebelo primitivo ganha fissuras e formam-se as folhas cerebelares (Mecha, 2010; Goldowitz, 1998). Os 10 lobos cerebelares primários podem ser reconhecidos no embrião de galinha entre E13 e E14 (Feirabend, 1990).

Em E14, a EGL encontra-se em seu período de maior espessura e claramente separada em duas zonas. Na região superior da EGL encontram-se as células em proliferação, enquanto na sua região inferior aglomeram-se células pós-mitóticas. No fim de E15, as células pós-mitóticas da EGL iniciam um período de intensa migração em direção à IGL. Após E15, as células em cesto e estreladas começam a se diferenciar. As conexões sinápticas dessas células formam-se quatro dias depois do início da diferenciação, que não se completa antes do nascimento. A diferenciação das células de Golgi ocorre por volta de E16 e as conexões com as fibras musgosas se estabelecem até E19 (Feirabend et al., 1990; Sepúlveda, 2005).

Figura 6 – Migração das células granulares durante o desenvolvimento cerebelar

Representação esquemática da migração das células granulares provenientes da EGL para a IGL. As células granulares migram tangencialmente na EGL e radialmente da EGL para a IGL. Na ML, as células granulares em migração podem associar-se a fibras da glia de Bergmann

FONTE: Adaptado de Spitzer et al. (2006)

Em E16, as células de Purkinje podem formar uma fileira única em algumas regiões, mas um arranjo com várias camadas de células constitui o padrão mais comum até E18 (Feirabend, 1990). Em E18, a EGL encontra-se bem menos espessa que nos períodos anteriores e já não apresenta atividade proliferativa; a ML encontra-se bem delimitada; as árvores dendríticas das células de Purkinje apresentam o padrão do adulto, com dendritos secundários e terciários (Luckner et al., 2001; Sepúlveda, 2005). Por volta de E18, inicia-se um período de intensa sinaptogênese no córtex cerebelar (Feirabend, 1990).

O desenvolvimento embrionário da galinha dura de 20 a 21 dias (Feirabend, 1990). No início do período pós-natal, a EGL desaparece e termina a migração das células granulares. Ao nascimento, o córtex cerebelar apresenta um padrão de laminação já bem similar ao do animal

adulto e inicia-se o período de maturação dos circuitos cerebelares (Feirabend, 1990; Sepulveda, 2005).

Os mecanismos moleculares envolvidos com o cometimento de cada linhagem são pouco conhecidos, assim como os sinais que levam à sua migração e diferenciação. Sabe-se que padrões específicos de expressão gênica relacionam-se à produção de diferentes moléculas sinalizadoras, de acordo com a região e a etapa do desenvolvimento (Goldowitz e Hamre, 1998). As glicoproteínas da matriz extracelular seriam componentes importantes no controle da migração e diferenciação dos tipos celulares, assim como as interações entre os diferentes tipos celulares (Barros et al., 2011).

Figura 7 – Córtex cerebelar de galinha em desenvolvimento

A)Imagens ilustram o crescimento massivo e aumento de complexidade durante o desenvolvimento cerebelar. B) Transformação histológica do córtex cerebelar durante o desenvolvimento. Imagens capturadas em microscópio de fluorescência, cortes sagitais da região superficial do córtex cerebelar em E14, E18 e P0. Os núcleos celulares foram marcados por DAPI. Siglas: EGL (camada granular externa), IGL (camada granular interna), ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 200 µm (A), 20 µm (B)
FONTE: Guedes (2012)

As células de Purkinje formam compartimentos delimitados pela expressão de proteínas específicas, os quais estariam relacionados à formação de áreas de contato entre fibras aferentes e eferentes (Larouche e Hawkes, 2006). O número de células de Purkinje correlaciona-se ao tamanho da população de células granulares (Goldwitz e Hamre, 1998). Além disso, fatores liberados pelas células granulares seriam fundamentais no estabelecimento do padrão de organização do cerebelo (Marzban, 2010). A comunicação entre os precursores de células granulares e a glia radial durante a migração relaciona-se à sobrevivência das primeiras e à indução da morfologia adulta da glia de Bergmann (Altmann e Bayer, 1997).

Diferentes síndromes genéticas associam-se a disfunções do desenvolvimento do cerebelo (Hoppenbrouwers et al., 2008). Alterações na anatomia cerebelar foram observadas em diferentes patologias (Sandyk et al., 1991; Varambally et al., 2006). Portadores de distúrbios do espectro do autismo apresentam grandes alterações no cerebelo, incluindo redução do número de células de Purkinje, diminuição da quantidade de substância cinzenta e aumento da substância branca (Carper e Courchesne et al., 2000; Diccico-Bloom, 2006).

Durante o desenvolvimento, o cerebelo é altamente vulnerável a fatores externos, como a contaminação por metais pesados e infecções virais (Varambally et al., 2006). Além disso, existe alteração do volume de regiões cerebelares em crianças e adolescentes com transtorno de estresse pós-traumático por maus tratos (De bellis e Kuchibhatla, 2006; Hoppenbrouwers et al., 2008).

Alterações na expressão de Cx43, Cx36 e Cx30 foram observadas em resposta à infecção pelo vírus BDV (Borna disease vírus) (Köster-Patzlaff et al., 2008, 2009). A expressão da Cx43 no cerebelo e no neocórtex foi alterada também pela infecção pelo vírus influenza (Fatemi et al., 2008). A ausência de Cx43 em astrócitos causa alterações histológicas no cerebelo (Wiencken-Barger et al., 2007). Portanto, mecanismos de regulação envolvendo a expressão de Cxs parecem ser importantes no desenvolvimento normal do cerebelo e podem ser parte dos mecanismos fisiopatológicos relacionados às malformações cerebelares.

A Cx43 e a Cx36 foram associadas a importantes processos durante o desenvolvimento do SNC (Elias et al., 2007; Klander e Katz, 1998). Apesar disso, não se conhece bem o padrão de expressão dessas Cxs no cerebelo de vertebrados. Em trabalhos anteriores, nenhuma investigação detalhada da localização da Cx36 e da Cx43 ao longo do desenvolvimento cerebelar foi realizada (Belluardo et al., 2000; Dermietzel et al., 1989; Van der Giessen et al., 2006). Além disso,

utilizaram-se técnicas pouco sensíveis para a quantificação da expressão gênica de Cxs na maioria dos estudos já realizados e a análise simultânea dos níveis protéicos e de RNAm foi raramente empregada (Aberg et al., 1999; Van der Giessen et al., 2006).

Tabela 2– Marcos no desenvolvimento do cerebelo de galinha

Evento	Idade	Referência
Células que originam a EGL são formadas na zona ventricular	E2-E5	Feirabend (1990)
Surgimento das células de Purkinje no epitélio ventricular	E3,4,5	Feirabend (1990)
Aparecimento da EGL	Fim de E5	Feirabend (1990)
Atividade Mitótica da EGL	E8 -E15	Luckner et al (2001)
Córtex cerebelar formado por EGL e ICCL	E10	Feirabend (1990)
Diferenciação das células de Purkinje na ICCL	E10 - 12	Sepúlveda (2005)
Aparecimento das primeiras sinapses	E12	Sepúlveda (2005)
IGL pode ser claramente visualizada	E14	Bastianelli (2003)
Início de período de intensa migração de células granulares	Fim de E15	Feirabend (1990)
Início da diferenciação das células em cesto e estreladas começam a se diferenciar na ML	E16	Sepúlveda (2005)
Início da diferenciação das células de Golgi na GL	E16	Sepúlveda (2005)
Células de Purkinje organizadas em monocamada e com árvore dendrítica completamente formada	E18	Bastianelli (2003)

FONTE: Guedes (2012), elaboração da tabela com base em informações provenientes das referências citadas

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar a ontogênese da Cx36 e da Cx43 no cerebelo de galinha.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a expressão gênica da Cx36 e da Cx43 no cerebelo por meio da técnica de PCR em tempo real.
- Avaliar os níveis protéicos da Cx36 e da Cx43 no cerebelo por meio da técnica de Western blotting.
- Analisar o padrão de distribuição da Cx36 e da Cx43 no córtex cerebelar por meio da técnica de imuno-histoquímica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados com material proveniente do encéfalo de galinha (*Gallus gallus*) da raça White Leghorn no período embrionário, no dia do nascimento (P0) e com 16 dias pós-natais (P16). Os ovos e animais P0 foram fornecidos pela Granja Kunitomo Ltda (Mogi das Cruzes, São Paulo). Os animais no período pós-natal foram mantidos em biotério com temperatura de 32 °C $\pm$ 1 °C, ciclo claro/escuro de 12 horas, ração e água *ad libitum*. Os embriões foram coletados com 12, 14, 16 e 18 dias de desenvolvimento (E12, E14, E16, E18) de ovos fecundados mantidos em incubadora com temperatura 37 °C $\pm$ 1 °C e umidade controlada. Para a coleta de material para os experimentos, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (Ann Arbor, MI, EUA) e cloridrato de xilazina (West Haven, CT, EUA), 15mg/100g e 2mg/100g de peso corporal (i.m), respectivamente. A eutanásia foi realizada por decapitação. Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.2 PCR EM TEMPO REAL

Os cerebelos dos animais (E12 a P16, n = 5 por idade) foram retirados imediatamente após a decapitação, congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C. Todas as amostras foram processadas simultaneamente em cada etapa do PCR em tempo real, desde a extração do RNA.

Para a extração do RNA total, cada amostra foi homogeneizada em 1 ml do reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com o auxílio de um sonicador. Após a adição de 200 μ L de clorofórmio, o material homogeneizado foi centrifugado (12000 RPM, 4°C) por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a precipitação do RNA pela adição de 500 μ L de isopropanol. As amostras foram centrifugadas novamente por 10 minutos (12000 RPM, 4 °C) e o sobrenadante descartado. O precipitado contendo o RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado por 10 minutos (7500 RPM). Novamente o sobrenadante foi descartado e o

precipitado ressuspensionado em 25 µL de água livre de RNase (Promega, Madison, WI, EUA). O DNA residual foi removido pela adição de DNase I (Amersham, Piscataway, NJ, EUA) conforme protocolo do fabricante.

A concentração de RNAm foi quantificada em espectrofotômetro (260nm). Após a quantificação, foi realizada a reação de transcrição reversa (RNAm para cDNA). Primeiramente adicionamos 4 µg do RNA total a 1 µL de oligo dT (0,5 µg; Invitrogen-Life Technologies, Gathersburg, MD, EUA). Essa solução foi incubada por 10 minutos a 65 °C e depois resfriada. Em seguida, adicionaram-se 4 µL de tampão, 2µL de 0.1M DTT, 1 µL de dATP, dTTP, dCTP e dGTP (10mM) e 1µL da transcriptase reversa SuperScript III (200 U; Invitrogen). A reação foi mantida a 50 °C por 60 min e inativada pelo aquecimento a 70 °C por 15 minutos. A cada 5ng de cDNA adicionou-se 100 nM de primers e SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems-Life Technologies). A omissão do cDNA, condição chamada de NTC (no template control), foi utilizada como controle no processo de quantificação. Encontram-se na Tabela 3, as sequências dos primers utilizados para a Cx43, Cx36 e para o GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), utilizado como controle interno.

Tabela 3 - Sequência dos primers utilizados nos experimentos de PCR

Gene (Código GenBank)	Primers
Cx43 (NM019281)	Up: 5'- CTGAGTGCCATCTACACCTGTGA-3' Down: 5'- TTGGACGGGACAGGAAACA-3'
Cx36 (AY324140)	Up: 5'-TTGGTGTTTCATGTTTGCTGTCA-3 Down: 5'- CCAGCCCAAGTGGTTCAGTT-3'
GAPDH (AF047874)	Up:5'- GGTGCTAAGCGTGTATCATCTCA-3' Down: 5' - CATGGTTGACACCCATCACAA-3'

A análise quantitativa da expressão gênica foi realizada no Rotor-Gene Q (Qiagen, Valencia, CA, EUA). No processo de quantificação, após a ativação inicial a 50 °C por 2 minutos e a 95 °C por 10 minutos, as condições de ciclo foram 95 °C por 10 segundos e 60 °C por 1 minuto. As curvas de dissociação para avaliação da especificidade dos primers foram obtidas pelo aquecimento das amostras de 60 °C até 95 °C.

3.3 WESTERN BLOTTING

Os cerebelos dos animais (E12 a P16, n = 5 por idade) foram retirados imediatamente após a decapitação, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70 °C. Todas as amostras foram submetidas ao processo de extração de proteínas simultaneamente.

Para a extração de proteínas, cada amostra foi homogeneizada em tampão de extração (Tris pH 7,4 100 mM, EDTA 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/mL) com auxílio de um sonicador. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (30 minutos, 12.000 RPM) a 4°C. O material sobrenadante, em que se encontravam as proteínas presentes nas amostras, foi coletado. Parte desse material foi utilizada para a dosagem do conteúdo protéico das amostras pelo método Bradford (Amresco, Solon, OH, EUA). A proteína albumina foi utilizada como padrão. Ao restante dele foi adicionado o tampão Laemmli contendo DTT 100 mM e fervido em banho-maria por 5 minutos. O material resultante dessa mistura foi utilizado nos experimentos de Western blotting.

O equivalente a 100 µg das proteínas extraídas das amostras foi submetido à separação por eletroforese em géis de acrilamida a 12%, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), em cuba para mini-gel (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas (Trans-Blot cell system, Bio-Rad) para membranas de nitrocelulose (Milipore, Billerica, MA, EUA) em tampão contendo SDS.

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó ou albumina em salina tamponada contendo Tween 20 (TTBS; 0,01 M de Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,05% de Tween 20). As membranas permaneciam no bloqueio por pelo menos duas horas a temperatura ambiente. Após serem lavadas em TTBS foram incubadas a 4 °C overnight com um anticorpo primário diluído em uma solução de

albumina a 12% em TTBS. A β -actina foi utilizada como controle interno (1:10000, No. A5316, Sigma, St. Louis, MO, EUA).

Para a Cx36, utilizamos um anticorpo primário policlonal que reconhece a sequência de aminoácidos 296-304 da Cx36 de humanos (1:750, No. 36-4600, Invitrogen, San Francisco, CA, EUA). A sequência desse anticorpo apresenta 100% de homologia com a sequência de aminoácidos da região C-terminal da Cx36 da galinha. Nos experimentos para a Cx43, utilizamos um anticorpo policlonal que reconhece a sequência de aminoácidos 252-270 da Cx43 do rato (1:1000, no. 71-0700, Zymed/Invitrogen, San Francisco, CA, EUA). Essa sequência apresenta 100% de homologia com a mesma região da Cx43 da galinha. O anticorpo contra a Cx43 pode originar duas bandas, localizadas por volta de 41 e 43 KDa.

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas em TTBS e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra conjugado à peroxidase (Jackson Immuno Research Lab., West Grove, Pennsylvania, EUA; 1:5000) diluído em solução de leite em pó em TTBS a 1%. A seguir, as membranas foram novamente lavadas em TTBS. A detecção das proteínas marcadas foi realizada com um sistema quimioluminescente (ECL, Jackson Immuno Research Lab., West Grove, Pennsylvania, EUA). A reação foi visualizada por meio de filmes radiográficos (Bio-Rad). A análise densitométrica das bandas observadas nos filmes radiográficos foi medida no programa Imaje J (programa de domínio público, National Institute of Health, EUA). Para a Cx43, as bandas de 41 e 43KDa não aparecem em todos os experimentos. Por isso, essas duas bandas não foram quantificadas separadamente.

3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A coleta do material para imuno-histoquímica, assim como o processo de fixação do espécime, variou com a Cx analisada. Trabalhos anteriores já haviam mencionado a sensibilidade dos anticorpos para Cxs ao método de fixação (Meier et al., 2002; Kihara et al., 2008). Tanto para Cx36 quanto para a Cx43 foram testados protocolos diversos com diferentes fixadores, em que foram variados parâmetros como o tempo de exposição ao fixador e sua concentração.

Em nossos testes, obtivemos bons resultados para a Cx43 com o fixador paraformaldeído (PFA), especialmente em concentrações mais baixas que 4%, a mais comum em protocolos de imuno-histoquímica. Optamos pelo uso do PFA a 2% nos experimentos com Cx43, que fornece boa qualidade de marcação associada a uma razoável qualidade morfológica. Para a Cx36, não observamos marcação quando o PFA foi utilizado como fixador. No entanto, o álcool etílico (ETOH) forneceu boa qualidade de marcação. Por isso, optamos por utilizá-lo. Entretanto, o uso do ETOH trouxe alguns problemas, como a mais baixa qualidade morfológica dos tecidos fixados e a grande limitação em experimentos de dupla-marcação, já que muitos anticorpos não fornecem bons resultados com esse fixador. Os cortes do encéfalo de E12 não resistiram à fixação por ETOH e, por isso, não temos resultados de imuno-histoquímica para a Cx36 nessa idade.

Nos experimentos para a Cx36, os animais foram anestesiados e depois decapitados. O encéfalo inteiro foi retirado e congelado imediatamente em isopentano mantido em gelo seco. Para a Cx43, os animais foram perfundidos com solução salina (0,9%) seguida de PFA a 2%. Em seguida, foram pós-fixados em PFA 2% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 (PB) por um período de 4 horas. Após esse período, os encéfalos foram mantidos em sacarose 30% em PB por 24-48 horas e congelados em gelo seco. Todos os encéfalos congelados foram estocados a -70 °C até o momento de serem processados.

Os encéfalos fixados com ETOH e com PFA foram seccionados em criostato e imediatamente coletados em lâminas de vidro gelatinizadas. Foram utilizados cortes de 12µm (P16, P0 e E18 fixado por PFA) ou 30µm (tecidos de embrião fixados em ETOH). Para a Cx36, a fixação dos tecidos foi realizada apenas após a confecção das lâminas. No processo de fixação, as lâminas foram mantidas por 20 minutos em ETOH a -20 °C.

As lâminas com os cortes de encéfalo foram incubadas de 12 a 16 horas com anticorpos primários diluídos em solução de NDS 5% em Triton-X 100 0.3% em PB. Com o objetivo de determinar quais tipos celulares expressam cada isoforma de Cx, utilizamos experimentos de dupla-marcação. Nesse caso, as lâminas foram incubadas simultaneamente com um anticorpo contra Cx43 ou Cx36 e um anticorpo reconhecido como marcador específico de um tipo celular. A omissão do anticorpo primário foi usada como controle negativo em todos os experimentos de imuno-histoquímica, o que resultou em desaparecimento da marcação. Os padrões de marcação

descritos na literatura foram utilizados como referência. Além disso, os anticorpos contra Cxs resultaram em bandas no peso e com o padrão esperados nos experimentos de Western blotting.

Utilizamos os mesmos anticorpos policlonais contra a Cx36 e a Cx43 descritos na seção sobre Western blotting, nas concentrações de 1:100 e 1:200, respectivamente. Além desses anticorpos, utilizamos um segundo anticorpo para cada Cx e comparamos a distribuição espacial das marcações. Nos experimentos para a Cx36 utilizamos um anticorpo monoclonal que reconhece um trecho da região C-terminal da Cx36 de ratos e camundongos (produzido em camundongo, no. 37-4600, Invitrogen). Para a Cx43, foi usado um anticorpo monoclonal que reconhece a sequência de aminoácidos 360-370 da Cx43 do rato (produzido em camundongo, no. 13-8300, Invitrogen). Como descrito em estudos prévios, esse anticorpo reconhece a Cx43 apenas quando a serina no resíduo 368 está desfosforilada (Li et al., 1998).

Nos experimentos de dupla-marcação utilizamos os seguintes marcadores: anti-PAN/neurofilamentos, que marca corpos celulares e processos de neurônios (produzido em camundongo, 1:500, 18-0171, Zymed/Invitrogen); anti-calbindina, marcador de células de Purkinje (produzido em camundongo, 1:750, C-8666, Sigma); Anti-MAP2, para corpos celulares e dendritos de neurônios (produzido em camundongo, 1:500, MAB3418, Chemicon, Temecula, CA, EUA); anti-GFAP (glia fibrillary acidic protein), marca astrócitos (produzido em camundongo, 1:750, G3893, Sigma ou produzido em coelho, 18-0063, Invitrogen); anti-mielina/oligodendrócitos, que marca corpos celulares e processos de oligodendrócitos (produzido em camundongo, 1:400, MAB345, Chemicon) e anti-mGluR2/3, receptores metabotrópicos de glutamato do tipo 2 e 3 (produzido em coelho, 1:200, AB1553, Chemicon). Este último anticorpo vem sendo usado como um marcador de células de Golgi, os únicos neurônios do cerebelo que apresentam mGluR2/3 (Vervaeke et al., 2010).

Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram incubadas com os anticorpos secundários diluídos em Triton-X 100 0.3% em PB por duas horas. Em seguida, as lâminas foram lavadas por duas vezes de três minutos em PB 0.1M e fechadas com glicerol. Utilizamos anticorpos secundários conjugados aos fluoróforos FITC (fluorescein isothiocyanato, Jackson Labs, West Grove, PA, 1:200); TRITC (tetra-methyl rhodamine isothiocyanate, Jackson Labs, 1:100-1:200) ou Cy5 (indodicarbocyanine, Jackson Labs, 1:200).

A contracoloração com DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) e PI (iodeto de propídeo, Sigma, St. Louis, MO, EUA)

foi usada para facilitar a identificação das camadas do córtex cerebelar. O DAPI e o PI permitem a visualização de núcleos de células. O DAPI liga-se fortemente a regiões ricas em DNA (Kapuscinski et al., 1995). O PI liga-se principalmente a DNA, intercalando bases, mas também a RNA (Suzuki et al., 1997). As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência Nikon E1000 acoplado a uma câmera digital Nikon DCM1200 ou em microscópio confocal Zeiss L SM 510. As figuras foram montadas com o programa Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, EUA).

3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Na análise dos resultados do PCR em tempo real, utilizamos a quantificação relativa, na qual os dados são apresentados em relação a outro gene, chamado de controle interno. Escolhemos o método comparativo (Comparative C_T ou $2^{-\Delta\Delta CT}$) para apresentar nossos dados, seguindo as diretrizes de Schmittgen e Livak (2008).

O C_T (cycle threshold) é definido como o número de ciclos necessários para o sinal fluorescente detectado pela máquina de PCR cruzar um limiar, que marca o início da fase de exponencial do aumento do produto da reação. O valor de C_T é inversamente proporcional ao nível de expressão do gene analisado (Schmittgen e Livak, 2008).

No método comparativo, primeiramente determina-se o ΔC_T , pela subtração do valor do C_T do gene de interesse pelo controle interno, o GAPDH no caso deste trabalho. No cálculo do $\Delta\Delta CT$, utiliza-se a média do ΔCT do grupo controle (P16) como uma constante arbitrária, que é subtraída de cada ΔCT . O valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ equivale a quantas vezes (Fold change) a expressão de um gene foi diferente da expressão do controle interno (Medhurst et al., 2000).

Os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com o fator idade (E12, E14, E16, E18, P0 ou P16). Após a ANOVA, o teste de Tukey foi utilizado para determinar quais idades apresentaram resultados diferentes entre si (análise post hoc). Para o GAPDH, a ANOVA foi realizada com os valores de C_T . O nível de significância utilizado foi 0.05.

Para o Western blotting, as densidades ópticas (DO) das bandas para as proteínas de interesse em cada amostra foram normalizadas pelos respectivos valores de DO para β -actina. Os

resultados dessa razão foram submetidos a uma ANOVA de um fator seguida pelo teste de Tukey, assim como descrito anteriormente para o PCR.

Os resultados de imuno-histoquímica foram analisados qualitativamente. Neste caso, foram considerados válidos os resultados reproduzidos em pelo menos três experimentos independentes.

4 RESULTADOS

4.1 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CONEXINAS

A expressão gênica de Cxs no cerebelo de galinha foi quantificada por meio da técnica de PCR em tempo real. Nossos resultados mostraram que os níveis de RNAm da Cx43 e da Cx36 foram modulados ao longo do desenvolvimento cerebelar (Figura 8).

A expressão do gene da Cx43 aumentou muito entre E12 e P16. A quantidade de RNAm em E12 representava apenas 4% do total de P16. As médias dos valores de ΔC_T em valores absolutos ($\pm$ EPM, erro padrão da média) e em porcentagem podem ser encontradas na Tabela 4. A partir de E12, houve um aumento progressivo nos níveis médios de RNAm. A análise pela ANOVA mostrou um efeito significativo do fator idade nos níveis de RNAm ($p < 0.01$). A expressão de Cx43 foi significativamente menor em E12 (24.6 vezes, $p < 0.01$), E14 (13.7 vezes, $p < 0.01$), E16 (6.3 vezes, $P < 0.01$) e E18 (4.0 vezes, $p < 0.01$) que em P16. Os valores de RNAm em E12 (14.3 vezes, $p < 0.05$) e E14 (7.9 vezes, $p < 0.05$) foram também diferentes de P0.

Observamos também um aumento na expressão gênica da Cx36 durante o desenvolvimento cerebelar. A análise estatística mostrou um efeito significativo da idade nos níveis de RNAm ($p < 0.01$). Entretanto, apenas a expressão de Cx36 em E12 (5.1 vezes, $p < 0.05$) e E14 (3.0 vezes, $p < 0.05$) foram significativamente menores que em P16. Houve diferença também nos níveis de RNAm em E12 (5.4 vezes, $p < 0.01$) e E14 (3.2 vezes, $p < 0.05$) em comparação a P0. A quantidade de RNAm de Cx36 observada em E12 foi de 18% do total de P16, um nível mais alto do que aquele observado para a Cx43. Em P0, a expressão gênica de Cx36 atingiu o nível observado em P16.

A expressão gênica da Cx36 e da Cx43 foi quantificada em relação aos níveis de GAPDH. A expressão desse gene não variou significativamente no período estudado (ANOVA, $p > 0.05$), conforme esperado para um gene utilizado como controle interno. A média dos valores de CT para o GAPDH e as curvas de amplificação para esse gene estão representadas na Figura 9.

Figura 8 – Expressão gênica de Cxs no desenvolvimento do cerebelo

Gráficos contendo as médias dos valores de $\Delta\Delta C_T$ durante o desenvolvimento cerebelar (E12, E14, E16, E18, P0 e P16), normalizados em relação ao P16. As barras representam o erro padrão da média. * $p < 0.05$ vs P16
FONTE: Guedes (2012)

Figura 9 – Expressão de GAPDH no desenvolvimento do cerebelo

A) Gráfico contendo as médias dos valores de C_T durante o desenvolvimento cerebelar (E12, E14, E16, E18, P0 e P16) para o GAPDH, utilizado como controle interno. As barras representam o erro padrão da média. B) Curvas de amplificação obtidas pela utilização do primer para o GAPDH. Todas as amostras de cada idade estão representadas por linhas individuais (n=5 por idade). A curva não amplificada representa o NTC (controle, ausência de cDNA). A Figura foi fornecida pelo programa para análise de resultados do sistema Rotor-Gene

FONTE: Guedes (2012)

Tabela 4 – Expressão gênica da Cx36 e Cx43 no cerebelo

	Cx36		Cx43	
	$\Delta CT \pm EPM$	% de P16	$\Delta CT \pm EPM$	% de P16
E12	6,46 $\pm$ 0,23	18,77%	9,82 $\pm$ 0,34	4,06%
E14	5,68 $\pm$ 0,23	32,53%	9,11 $\pm$ 0,51	7,27%
E16	5,41 $\pm$ 0,29	40,89%	7,73 $\pm$ 0,25	15,79%
E18	4,81 $\pm$ 0,30	64,35%	7,16 $\pm$ 0,32	24,59%
P0	4,10 $\pm$ 0,35	106,26%	5,82 $\pm$ 0,18	58,10%
P16	4,10 $\pm$ 0,25	100,00%	5,13 $\pm$ 0,30	100,00%

Média dos valores de $\Delta CT \pm EPM$ (coluna da esquerda) e porcentagem da média de P16 (coluna da direita) em cada idade

FONTE: Guedes (2012)

4.2 NÍVEIS PROTÉICOS DE CONEXINAS NO DESENVOLVIMENTO DO CEREBELO

Os níveis protéicos da Cx36 e da Cx43 foram avaliados pela técnica de Western blotting. A análise densitométrica das bandas revelou uma regulação dos níveis protéicos de Cx36 e de Cx43 durante o desenvolvimento do cerebelo (Figura 10).

Observamos um aumento significativo dos níveis protéicos de Cx43 no período de E12 a P16 ($P < 0.01$). As médias dos valores de DO em E12 ($p < 0.01$), E14 ($p < 0.01$), E16 ($p < 0.01$), E18 ($p < 0.01$) e P0 ($p < 0.01$) foram menores que em P16. A média obtida para E12 representa uma porcentagem muito pequena da média de P16 (Tabela 5).

O anticorpo usado para a análise da Cx43 apresenta reatividade independente dos estados de fosforilação da proteína. Esse anticorpo frequentemente origina duas bandas, localizadas por volta de 41 e 43 KDa. A banda de maior peso molecular representa maiores graus de fosforilação da proteína. A presença de duas bandas não foi observada em todos os experimentos realizados. Nos experimentos em que essas duas bandas apareceram, foram detectadas em todas as idades avaliadas neste trabalho.

Para a Cx36, houve também um aumento dos níveis protéicos ao longo do desenvolvimento cerebelar ($p < 0.001$). As médias de E12 ($p < 0.001$), E14 ($p < 0.001$), E16 ($p < 0.001$), E18 ($p < 0.001$) e P0 ($p < 0.005$) foram significativamente menores que a de P16.

Figura 10 - Níveis protéicos de conexinas no cerebelo em desenvolvimento

Médias dos valores de densidade óptica (DO, Cx/ beta-actina) em cada idade normalizadas pelo respectivo valor de P16 para Cx36 (A) e Cx43 (B). As barras representam o EPM. * $p < 0.05$ vs. P16. Nos Western blots a ordem das bandas corresponde às idades apresentadas no gráfico.

FONTE: Guedes (2012)

Tabela 5 – Valores de densidade óptica obtidos nos experimentos de Western blotting

	Cx36		Cx43	
	(DO $\pm$ EPM)	Porcentagem (em relação a P16)	(DO $\pm$ EPM)	Porcentagem (em relação a P16)
E12	0,49 $\pm$ 0,13	12,0%	0,03 $\pm$ 0,02	0,5%
E14	0,42 $\pm$ 0,11	10,1%	0,16 $\pm$ 0,08	2,5%
E16	0,72 $\pm$ 0,08	18,0%	0,31 $\pm$ 0,15	4,8%
E18	0,86 $\pm$ 0,20	21,0%	0,59 $\pm$ 0,29	9,0%
P0	1,72 $\pm$ 0,31	42,5%	2,40 $\pm$ 0,63	36,0%
P16	4,01 $\pm$ 1,14	100,0%	6,57 $\pm$ 1,52	100,0%

Médias dos valores de densidade óptica (DO, Cx/ beta-actina) $\pm$ EPM no período de E12 a P16 acompanhadas dos seus valores em porcentagem em relação a P16.

FONTE: Guedes (2012)

4.3 PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE CONEXINAS NO CÓRTEX CEREBELAR

A localização da Cx36 e da Cx43 no córtex cerebelar foi avaliada por meio da técnica de imuno-histoquímica. Experimentos de dupla-marcação foram utilizados para determinar em que tipos celulares essas Cxs são expressas. A identificação das camadas do córtex cerebelar foi realizada pela contracoloração por DAPI ou PI.

4.3.1 *Conexina 43*

A distribuição espacial da Cx43 no córtex cerebelar de E12 a P16 está representada na Figura 11. No córtex cerebelar de E12, observamos uma marcação fraca para a Cx43 na EGL e na ICCL. Em E14 e E16, a Cx43 foi encontrada na EGL, ML e IGL. Nessas duas idades observaram-se áreas mais fortemente marcadas na região da PCL. Em E16, essas áreas imunorreativas para a Cx43 formaram padrões similares a corpos celulares emitindo processos em direção à ML. A expressão de Cx43 aumentou na ML e na IGL do córtex de E18. Na PCL, uma marcação puntiforme foi vista entre os corpos celulares. Apenas alguns pontos imunopositivos foram observados na EGL.

No córtex cerebelar de P0, a Cx43 apareceu na GL, PCL e na ML. Na ML, linhas de orientação radial formadas pela marcação puntiforme da Cx43 foram frequentemente observadas. Em P16, a Cx43 foi encontrada na ML e, com maior intensidade, na PCL e na GL. Na GL, foram observados pontos imunopositivos para a Cx43 contornando regiões entre os corpos celulares. Regiões com grande densidade de Cx43 foram frequentemente encontradas logo abaixo da PCL. Uma linha fortemente marcada pela Cx43 foi observada na superfície do cerebelo (Figura 12), provavelmente pés-terminais da glia de Bergmann formando a glia limitans do cerebelo. A Cx43 foi também encontrada na substância branca cerebelar.

Utilizamos experimentos de dupla-marcação para investigar a localização da Cx43 em relação a astrócitos, oligodendrócitos e neurônios. Em P16, realizamos experimentos de dupla-marcação entre a Cx43 e dois marcadores neuronais, anti-neurofilamentos (PAN) e anti-calbindina (CB) (Figura 13). Na GL, áreas contornadas pela marcação puntiforme de Cx43 podem ser claramente vistas em regiões entre corpos celulares. Provavelmente glomérulos ocupam essas áreas. Ainda na GL, observamos longas fibras marcadas por PAN. Observamos a

Cx43 na proximidade das estruturas marcadas por PAN na GL e PCL, com raros pontos de co-localização. Em algumas regiões, as fibras marcadas por PAN parecem contornadas por linhas formadas por pontos imunopositivos para a Cx43.

Na ML, observa-se Cx43 em torno das estruturas marcadas por CB e PAN. Observamos uma forte imunorreatividade para o PAN no que parecem ser células em cesto e seus processos em torno dos corpos celulares e segmento inicial do axônio de células de Purkinje. Os corpos celulares e árvores dendríticas das células de Purkinje marcados por CB podem ser vistos na PCL e ML.

Para avaliar se a Cx43 encontra-se em astrócitos, experimentos de dupla-marcação entre Cx43 e GFAP foram realizados (Figura 14). Observamos pontos de co-localização entre as duas marcações em todas as camadas do córtex cerebelar, com maior intensidade na GL. A Cx43 foi observada em fibras marcadas pelo GFAP e orientadas radialmente na ML, provavelmente processos da glia de Bergmann. Houve também co-localização entre Cx43 e GFAP na substância branca. A distribuição do GFAP no cerebelo de P16 pode ser observada na Figura 15. Processos marcados por GFAP foram encontrados em todas as camadas do córtex cerebelar. Na substância branca próxima ao córtex cerebelar, longas fibras marcadas pelo GFAP foram observadas.

Na Figura 16, são apresentadas imagens provenientes de experimentos realizados com o anticorpo monoclonal para a Cx43. O padrão de distribuição da marcação para Cx43 é bastante similar àquele obtido pelo anticorpo policlonal para a Cx43. Além disso, também observamos co-localização da marcação com o anticorpo monoclonal para a Cx43 com o GFAP.

Em P16, realizamos também experimentos de dupla-marcação entre Cx43 e o anticorpo anti-oligodendrócitos (Figura 17). Encontram-se processos de oligodendrócitos na GL, PCL e, mais raramente, na região inferior da ML. Pontos de co-localização entre a Cx43 e processos de oligodendrócitos foram observados principalmente na GL de P16.

No córtex cerebelar de P0, células bipolares que parecem ligadas a fibras marcadas por GFAP foram observadas frequentemente (Figura 18). Elas são provavelmente precursores de células granulares migrando em associação às fibras da glia de Bergmann. Essas células bipolares apresentam diferentes orientações de acordo com a altura da ML em que se encontram. Observam-se áreas de co-localização entre Cx43 e GFAP na proximidade dessas células em migração, inclusive no que parecem ser pontos de contato com as fibras da glia de Bergmann.

Em E18 e P0, a co-localização entre Cx43 e GFAP foi observada em todas as camadas do córtex cerebelar (Figura 19). Na ML de E18, algumas fibras da glia de Bergmann foram marcadas por GFAP e co-localizaram com Cx43. Em P0, a Cx43 foi observada por toda a extensão dos muitos processos marcadas por GFAP na ML. Na superfície do cerebelo de P0, observam-se dilatações nas extremidades das fibras da glia de Bergmann, provavelmente pós-terminais. Nessas estruturas, houve também co-localização entre GFAP e Cx43.

Na região de passagem de fibras da GL de E18, observamos processos radiais marcados para GFAP (Figura 19). Nessa região, a marcação da Cx43 também forma linhas de orientação radial e alguns pontos de co-localização com o GFAP foram encontrados. Tanto a marcação por GFAP quanto a sua co-localização com a Cx43 são mais frequentes na região superior da GL. Processos de oligodendrócitos também foram observados na GL de E18, principalmente em sua porção mais inferior. Encontramos apenas alguns poucos pontos de co-localização com a Cx43.

Figura 11 - Distribuição da Cx43 no córtex cerebelar em desenvolvimento

Imagens de imunofluorescência para a Cx43 (verde), contracoradas por PI (Iodeto de propídeo, vermelho) em cortes sagitais do córtex cerebelar de galinha no período de E12 a P16 (microscopia confocal). Siglas: EGL (camada granular externa), IGL (camada granular interna), ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 20 μm. Setas: concentração de Cx43 na região da PCL (E16) e em torno dos glomérulos (P16).

FONTE: Guedes (2012)

Figura 12 - Distribuição da Cx43 no cerebelo de P16

Imagens de imunofluorescência para a Cx43 (verde), contracoradas por PI (Iodeto de propídeo, vermelho) em cortes sagitais do córtex cerebelar de galinha em P16 (microscopia confocal). Siglas: ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 50 μ m. Seta: Cx43 na superfície do cerebelo.

FONTE: Guedes (2012)

Figura 13 – Localização da Cx43, neurofilamentos e calbindina no córtex cerebelar de P16.

Imagens de corte sagital do córtex cerebelar de P16 (microscopia confocal). A) Dupla-marcação, Cx43 (verde) e neurofilamentos (PAN, vermelho). B) Dupla-marcação, Cx43 (verde) e calbindina (CB, vermelho). C) Imagem em maior aumento da região da GL selecionada em A. Cx43 (verde) em dupla-marcação com PAN (vermelho) ou contraincorada por PI (Iodeto de propídeo, vermelho). D) Região da PCL delimitada em A. Cx43 (verde) em dupla-marcação com PAN (vermelho) ou contraincorada por PI (Iodeto de propídeo, vermelho). E) Células de Purkinje marcada por calbindina (CB, vermelho), GFAP (verde) e PI (azul). Observe que o processo de uma célula da glia de Bergmann, marcada por GFAP, contorna o corpo celular e o dendrito primário da célula de Purkinje. Siglas: ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 20 μ m (A e B), 10 μ m (E) e 5 μ m (C e D). Ponta de seta: Cx43 em torno de glomérulo (C), Cx43 em processo neuronal (D), axônio de célula de Purkinje (E).

FONTE: Guedes (2012)

Figura 14 – Experimento de dupla-marcação entre GFAP e Cx43

Imagens de dupla-marcação utilizando anticorpos contra Cx43 (verde) e GFAP (vermelho) em cortes sagitais do cerebello de galinha em P16 (microscopia confocal). A) Córtex na superfície cerebelar. Seta: ponto de co-localização entre fibra da glia de Bergmann e Cx43. B) Córtex cerebelar em contato com a substância branca. C) Imagem em maior aumento de uma região da GL. Seta: pontos imunopositivos para a Cx43 parecem revestir os processos marcados por GFAP. Siglas: ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular), WM (substância branca). Barras de escala: 20 μm (A e B), 5 μm (C).

FONTE: Guedes (2012)

Figura 15– Distribuição do GFAP no cerebelo de P16

Imagens de imunofluorescência de GFAP (verde) e marcação de DAPI (azul) em cortes sagitais do cerebelo de galinha em P16. A) Córtex cerebelar na proximidade da substância branca. B) Região de passagem de fibras aferentes e eferentes na camada granular. Observe os longos processos marcados por GFAP, que parecem ser provenientes da substância branca. Siglas: ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular), WM (substância branca). Barras de escala: 50 μ m.

FONTE: Guedes (2012)

Figura 16 – Cx43 no córtex cerebelar (anticorpo monoclonal).

Imagens de imunofluorescência em corte sagital do cerebelo de galinha (microscopia confocal). A) Cx43 (verde) e GFAP (vermelho) em P0. B) Região selecionada em A em maior aumento. Cx43 (verde), PI (vermelho). Cx43 pode ser observada entre corpos celulares de células de Purkinje (seta). C) Cx43 (verde) e GFAP (vermelho) em P16. Co-localização entre Cx43 e GFAP (ponta de seta). Siglas: ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 50 μ m (A), 5 μ m (B), 20 μ m (C).

FONTE: Guedes (2012)

Figura 17 – Cx43 e oligodendrócitos no córtex cerebelar de P16

Imagens de imunofluorescência em corte sagital do córtex cerebelar de galinha em P16 (microscopia confocal). A) Dupla-marcação, Cx43 (verde) e oligodendrócitos (OD, vermelho). B) Imagem em maior aumento da região selecionada em A. Siglas: ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 20 μ m. Seta indica pontos de co-localização entre Cx43 e OD.
FONTE: Guedes (2012)

Figura 18 – Cx43 e GFAP na migração celular

Imagens de imunofluorescência em corte sagital do córtex cerebelar de galinha em P0 (microscopia confocal). A) Córtex cerebelar marcado por PI (Iodeto de propídeo, vermelho). A região selecionada foi mostrada em maior aumento em B, C e D. B) Imunofluorescência para GFAP (verde) e contracoloração por PI (vermelho). C) Imunofluorescência para Cx43 (verde) e contracoloração por PI (vermelho). D) dupla-marcação, Cx43 (verde) e GFAP (vermelho). Siglas: ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 20 μ m (A), 10 μ m (B, C e D). Seta e ponta de seta: precursores de células granulares em migração. Asterisco: corpo celular de interneurônio inibitório da ML.
FONTE: Guedes (2012)

Figura 19 – Cx43 e marcadores gliais no córtex cerebelar de E18 e P0

Imagens de dupla-marcação em cortes sagitais de córtex cerebelar de galinha em E18 e P0 (microscopia confocal). A) E18, co-localização entre a Cx43 e GFAP. Observe os processos da glia de Bergmann na ML, marcados por GFAP (ponta de seta). B) P0, co-localização entre Cx43 e GFAP. Observe a região superior do córtex cerebelar e os pés-terminais da glia de Bergmann. C) e D) GL de E18, marcada por Cx43 (verde) e GFAP ou OD (vermelho). Siglas: EGL (camada granular externa), IGL (camada granular interna), ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular), OD (oligodendrócitos). Barras de escala: 20 μ m.

FONTE: Guedes (2012)

4.3.2 *Conexina 36*

A distribuição da Cx36 no córtex cerebelar de E14 a P0 está representada na Figura 20. A Cx36 foi observada em todas as camadas do córtex cerebelar durante o desenvolvimento embrionário. Em E14, a EGL foi a camada mais fortemente marcada. No córtex de E16, encontramos uma marcação mais intensa e mais homogeneamente distribuída que em E14. Observamos uma menor intensidade de marcação na parte mais externa da EGL em comparação a sua região mais interna, tanto em E14 quanto em E16. Em E18, observamos uma marcação intensa de Cx36 na ML. No córtex cerebelar de P0, a Cx36 foi encontrada principalmente na PCL e na GL. Diferente de E18, uma baixa imunorreatividade para a Cx36 foi observada na maior parte da ML, com exceção das áreas em torno de células granulares em migração.

Imagens em maior aumento do córtex cerebelar de E18 permitiram a visualização de detalhes da marcação para a Cx36 na ML e na EGL (Figura 21). Nessa condição, observamos que a Cx36 contorna os corpos celulares de células em migração na ML. Em algumas regiões da ML, a marcação para a Cx36 delinea processos emitidos por essas células. A região de transição entre EGL e ML encontra-se fortemente marcada. Na EGL, observamos apenas uma fraca imunorreatividade para a Cx43. A Figura 22 mostra a localização da Cx36 em diferentes regiões do córtex cerebelar de P16. Nessa idade, observamos que a imunorreatividade para a Cx36 encontra-se concentrada e homogeneamente distribuída na GL. Esse padrão de marcação foi confirmado pelo uso de um segundo anticorpo (monoclonal) para a Cx36 (Figura 23).

Na Figura 24, o maior aumento permite a visualização de uma marcação puntiforme de Cx36 esparsamente distribuída entre os corpos celulares da ML e PCL. Aglomerados de pontos imunopositivos para a Cx36 foram frequentemente observados em regiões entre corpos celulares da GL, áreas morfológicamente compatíveis com os glomérulos. Para avaliar se a Cx36 encontra-se em neurônios, utilizamos o anticorpo contra MAP2 em experimentos de dupla-marcação (Figura 24). No córtex cerebelar de P16, encontramos uma grande quantidade de dendritos marcados por MAP2 na GL. A marcação para MAP2 foi menos intensa na ML e PCL. A sobreposição das áreas marcadas por Cx36 e MAP2 revelou um alto grau de co-localização, indicando a presença de Cx36 em dendritos.

Figura 20 - Distribuição da Cx36 no córtex cerebelar em desenvolvimento.

Imagens de imunofluorescência para Cx36 (verde), contrainformadas por PI (Iodeto de propídeo, vermelho) em cortes sagitais de córtex cerebelar de galinha no período de E14 a P0 (microscopia confocal). Precursores de células granulares podem ser observados em todas as idades (ponta de seta) Siglas: EGL (camada granular externa), IGL (camada granular interna), ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 20 μm.
FONTE: Guedes (2012)

Figura 21 - Distribuição da Cx36 no córtex cerebelar de E18

Imagens de imunofluorescência para a Cx36 (verde), contracoradas por PI (Iodeto de propídeo, vermelho) em corte sagital de córtex cerebelar de galinha em E18 (microscopia confocal). A Cx36 contorna precursores de células granulares em migração (ponta de seta). Célula granular emite processo marcado por Cx36 (seta). Siglas: EGL (camada granular externa), ML (camada molecular). Barras de escala: 20 μ m.

FONTE: Guedes (2012)

Experimentos de dupla-marcação foram realizados também para Cx36 e mGluR2/3, que marca células de Golgi (Figura 25). No córtex de P16, observamos grande similaridade entre a distribuição espacial de Cx36 e mGluR2/3. Em aumentos maiores, não foram encontradas áreas de co-localização. No entanto, áreas marcadas para a Cx36 e o mGluR2/3 foram consistentemente observadas em grande proximidade uma da outra, situadas nitidamente na mesma estrutura celular.

A distribuição espacial do mGluR2/3 no córtex cerebelar pode ser vista na Figura 26. A maior concentração de mGluR2/3 foi encontrada na GL, principalmente na região superior dessa camada. Uma marcação mais fraca foi observada na região inferior da ML e na PCL. Em experimentos de dupla-marcação entre mGluR2/3 e MAP2 (Figura 26), observamos um alto grau

Figura 22 - Distribuição da Cx36 no córtex cerebelar de P16.

Imagens de imunofluorescência para a Cx36 (verde), contracoradas por PI (Iodeto de propídeo, vermelho) em cortes sagitais do córtex cerebelar de P16 (microscopia confocal). Siglas: ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 50 μ m.

FONTE: Guedes (2012)

Figura 23 - Distribuição da Cx36 no córtex cerebelar de P16 (anticorpo monoclonal)

Imagens de imunofluorescência para Cx36 (verde), contraincoradas por PI (Iodeto de propídeo, vermelho) em cortes sagitais do córtex cerebelar de galinha em P16 (microscopia confocal). Siglas: ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 20 μ m

FONTE: Guedes (2012)

de co-localização e uma grande similaridade entre os padrões de marcação, sugerindo que o mGluR2/3 encontra-se em dendritos de células da GL.

No córtex cerebelar de E18 (Figura 27), a marcação para o mGluR2/3 foi detectada na EGL, ML, PCL e IGL. Observamos áreas com diferentes graus de imunorreatividade intercaladas. Na EGL, terço médio da ML e PCL encontramos uma marcação relativamente fraca. Na IGL e nas regiões inferior e superior da ML encontramos uma maior quantidade de mGluR2/3. A imunorreatividade para a Cx36, conforme já descrito, foi mais intensa na ML. Na EGL, pontos imunopositivos para a Cx36 foram vistos entre linhas desenhadas pela marcação de mGluR2/3. Foram observados pontos de co-localização entre Cx36 e mGluR2/3 na IGL e, mais intensamente, na região superior da ML. Além disso, processos marcados pelo mGluR2/3 cruzam a ML em algumas regiões. Nessas estruturas também são vistos pontos de co-localização com a Cx36. Por fim, estruturas de formato estrelado são marcadas pelo mGluR2/3 na proximidade da PCL.

Figura 24 - Distribuição da Cx36 e MAP2 no córtex cerebelar de P16

Imagens de imunofluorescência em cortes sagitais do córtex cerebelar de galinha em P16 (microscopia confocal). A) Cx36 (verde) e contracoloração com PI (Iodeto de propídeo, vermelho). B) Dupla-marcação, Cx36 (verde) e MAP2 (vermelho). C) Imagem em maior aumento da região delimitada em B. Siglas: ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 20 μm (A e B) e 5 μm (C). Ponta de seta: aglomeração de pontos imunopositivos para Cx36.

FONTE: Guedes (2012)

Figura 25- Distribuição da Cx36 e mGluR2/3 no córtex cerebelar de P16

Imagens de imunofluorescência em cortes sagitais do córtex cerebelar de galinha em P16 (microscopia confocal). A) Cx36 (verde) e MAP2 (vermelho). B) Dupla-marcação entre Cx36 e MAP2. C) Imagem em maior aumento da região selecionada em B, dupla-marcação entre Cx36 e MAP2. D) Região selecionada em B: Cx36 (verde), PI (vermelho), mGluR2/3 (vermelho), conforme a identificação nas imagens. Siglas: ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 20 μ m (A e B) e 5 μ m (C e D)

FONTE: Guedes (2012)

Figura 26 – Distribuição de mGluR2/3 e MAP2 no córtex cerebelar de P16

Imagens de imunofluorescência de cortes sagitais do córtex cerebelar de P16. A) Córtex cerebelar de folhas cerebelares distintas separadas por substância branca (microscopia de fluorescência), mGluR2/3 (vermelho), DAPI (azul). B) Córtex na superfície cerebelar (microscopia confocal), mGluR2/3 (vermelho), PI (azul). C) Dupla-marcação, MAP2 (verde) e mGluR2/3 (vermelho) (microscopia confocal). Mesma região apresentada em B. Siglas: ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 50 μ m (A) e 20 μ m (B e C)

FONTE: Guedes (2012)

Figura 27 - Distribuição da Cx36 e mGluR2/3 no córtex cerebelar de E18

Imagens de imunofluorescência de cortes sagitais do córtex cerebelar de E18 (microscopia confocal). A) Cx36 (verde). B) MAP2 (vermelho). C) Cx36 (verde) e contracoloração por PI (vermelho). D) Dupla-marcação entre Cx36 (verde) e MAP2 (vermelho). E) Imagens em maior aumento da região da IGL selecionada em D. F) Imagem em maior aumento da região da EGL selecionada em D. Siglas: EGL (camada granular externa), IGL (camada granular interna), ML (camada molecular), PCL (camada de células de Purkinje), GL (camada granular). Barras de escala: 20 μ m (A, B, C e D) e 5 μ m (E e F)

FONTE: Guedes (2012)

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, estudamos a ontogênese da Cx43 e da Cx36 no cerebelo de galinha. Pela primeira vez, essas Cxs foram detectadas no cerebelo de aves. A Cx43 e Cx36 foram associadas a importantes processos durante o desenvolvimento do SNC (Condorelli e tal, 2000; Elias et al., 2007). Em vertebrados adultos, a Cx43 e a Cx36 são consideradas, respectivamente, a principal Cx de astrócitos e de neurônios (Condorelli et al., 2000; Bennett et al., 2003).

A expressão gênica dessas Cxs foi analisada por PCR em tempo real, uma técnica muito sensível e capaz de detectar pequenas quantidades de RNAm (Schmittgen e Livak, 2008). A quantidade de proteína foi analisada por Western blotting. A combinação dessas duas técnicas permitiu uma análise mais precisa da regulação dos níveis de Cx43 e Cx36. Por último, avaliamos a distribuição espacial e a localização celular da Cx43 e Cx36 por meio da técnica de imuno-histoquímica.

Neste estudo, foram avaliados os cerebelos de embriões de galinha em E12, E14, E16 e E18. Essas idades foram escolhidas por que se associam a processos importantes no desenvolvimento cerebelar. As primeiras sinapses aparecem no córtex cerebelar em E12. Em E14, células em proliferação, em migração e no processo final de diferenciação estão presentes ao mesmo tempo no córtex cerebelar, distribuídas em camadas facilmente identificáveis. Em torno de E16, começa uma migração massiva de células granulares da EGL. Por volta de E18, inicia-se um período de intensa sinaptogênese no córtex cerebelar (Feirabend et al., 1990; Sepulveda, 2005). Além disso, avaliamos animais no dia de seu nascimento e com 16 dias pós-natais. A comparação entre o animal no período pós-natal e o recém-nascido permite que sejam avaliados os efeitos da maturação dos circuitos cerebelares em função da experiência sensorial na expressão de Cxs.

5.1 CONEXINA 43

A Cx43 é a mais amplamente expressa das Cxs, sendo observada em dezenas de tecidos e em uma grande variedade de tipos celulares. No SNC, a Cx43 foi descrita em diferentes espécies de vertebrados e desde os períodos mais iniciais de desenvolvimento embrionário (Dermietzel, 1989; Belliveau et al., 1991; Kihara et al., 2008).

No encéfalo de ratos adultos, a Cx43 é a isoforma de Cx predominante, sendo expressa principalmente em astrócitos, mas também em células leptomenígeais, endoteliais e ependimais (Rozental et al., 2000; Nagy et al., 2003). No SNC em desenvolvimento, a Cx43 encontra-se frequentemente em células em proliferação nas zonas germinativas (Rozental et al., 2000). No encéfalo de ratos no período embrionário, observa-se a Cx43 principalmente na superfície ventricular, mas também na glia radial e em neurônios em migração (Elias et al., 2007).

A expressão de Cx43 ao longo do desenvolvimento pós-natal foi avaliada em diferentes estruturas do SNC de ratos, incluindo o córtex cerebral, hipocampo, retina e cerebelo (Aberg et al., 1999; Kihara et al., 2006). A idade na qual a Cx43 aparece ou apresenta seu pico de expressão varia com a região. Entretanto, na maioria das áreas estudadas, a expressão de Cx43 aumenta durante as duas primeiras semanas de desenvolvimento pós-natal, diminuindo posteriormente (Aberg et al., 1999). No cerebelo, esse aumento na expressão de Cx43 ocorre até pelo menos P17, sendo menos acentuado do que aquele observado em regiões como o córtex cerebral e hipocampo (Aberg et al., 1999).

A Cx43 foi estudada na retina e no núcleo vestibular tangencial da galinha (Popratiloff et al., 2003; Kihara et al., 2008). No núcleo tangencial, a Cx43 foi detectada em E16 e teve o pico de expressão ao nascimento (Popratiloff et al., 2003). Curiosamente, a expressão de Cx43 na retina de galinha diminuiu progressivamente a partir de E7 e atingiu níveis similares aos do adulto ainda no período embrionário (Kihara et al., 2008).

Neste trabalho, observamos um aumento progressivo da expressão gênica e nos níveis protéicos de Cx43 no cerebelo de galinha, no período embrionário e pós-natal. Nossos resultados indicam que a Cx43 começa a ser expressa por volta de E12 no cerebelo de galinha. Nesse estágio, observamos uma quantidade muito baixa de RNAm e de proteína em comparação a P16. Além disso, obtivemos apenas uma fraca imunoreatividade para a Cx43 no córtex cerebelar de E12.

Nos experimentos de imuno-histoquímica, observamos a marcação de Cx43 em todo o córtex cerebelar de E12 a E16, que pode ser atribuída à presença de precursores gliais e astrócitos imaturos. Estudos anteriores mostram que fatores de transcrição associados a precursores gliais estão espalhados por todo o cerebelo a partir de E10 (Kordes et al., 2005). Além disso, astrócitos imaturos foram observados durante o desenvolvimento cerebelar na IGL (Feirabend et al., 1990).

Observamos uma alta densidade de Cx43 na região das células de Purkinje no córtex cerebelar de E14 e, principalmente, em E16. Em E16, formam-se estruturas semelhantes a corpos celulares dos quais parecem sair processos em direção a ML. Um padrão semelhante foi visto no córtex cerebelar de ratos em P10 (Kordes et al., 2005). Possivelmente, essa concentração de Cx43 no córtex cerebelar de E14 e E16 deve-se à presença da glia de Bergmann na região. A partir de E13, as células da glia de Bergmann recém-diferenciadas formam uma linha na região das células de Purkinje no embrião de galinha (Pompolo e Harley, 2001; Kordes et al., 2005). Em E18, P0 e P16, observamos a Cx43 em astrócitos maduros e na glia de Bergmann, identificados pela marcação por GFAP.

Portanto, nossos resultados sugerem que a Cx43 encontra-se em células precursoras gliais, astrócitos imaturos e maduros no córtex cerebelar de aves, assim como foi descrito em outras regiões do SNC e em outras espécies de vertebrados (Dermietzel et al., 1991; Giaume, 1991; Kihara et al., 2008). O aumento da Cx43 a partir de E12 pode ser associado ao aumento no número de astrócitos e à sua maturação funcional.

A Cx43 pode participar da regulação do desenvolvimento por meio de diferentes mecanismos. Essa Cx forma hemicanais e canais intercelulares de JCs (Duval et al., 2002; Bennett et al., 2003; Goodenough e Paul, 2003). Os canais constituídos por Cx43 apresentam uma alta permeabilidade a AMPc, um importante segundo mensageiro envolvido com diversos mecanismos de sinalização intracelulares (Bukauskas et al., 2004). Os hemicanais de Cx43 associam-se à liberação de neurotransmissores como o ATP e o glutamato e podem funcionar como moléculas de adesão (Elias et al., 2007; Cotrina et al., 2008; Jiang et al., 2011; Orellana et al., 2011).

A Cx43 apresenta múltiplos sítios passíveis de fosforilação, os quais podem ser alvos de diferentes vias de sinalização (Solan e Lampe, 2009). A fosforilação da Cx43 foi associada ao

fechamento de canais intercelulares e hemicanais (Goodenough e Paul, 2009). Diversos fatores de crescimento podem fosforilar Cxs e alguns apresentam efeitos no grau de acoplamento via JCs (Le and Musil, 2001; Cameron et al., 2003). O NGF está relacionado aos processos de diferenciação e sobrevivência neuronal e fosforila a Cx43 via MAPK (Cushing et al., 2005).

O anticorpo policlonal que utilizamos nos experimentos de imuno-histoquímica e Western blotting liga-se a Cx43 independentemente do seu grau de fosforilação. Esse anticorpo pode gerar duas bandas em Western blots, referentes a dois diferentes estados de fosforilação da Cx43 (Laird et al., 1991; Kihara et al., 2008). Neste trabalho, obtivemos essas duas bandas em todas as idades estudadas. Portanto, a Cx43 apresentou consistentemente diferentes estados de fosforilação. Esses resultados sugerem que a fosforilação da Cx43 seja um importante mecanismo regulatório durante o desenvolvimento do cerebelo de galinha.

5.1.1 A Cx43 na glia radial

A glia radial foi observada em diferentes regiões do encéfalo em desenvolvimento. No córtex cerebral, a glia radial situa-se na zona ventricular e estende uma fibra até a superfície, origina diferentes tipos celulares, principalmente neurônios, e serve de suporte para a migração celular (Farkas e Hutner, 2008; Malatesta et al., 2008; Noctor et al., 2008).

A Cx43 encontra-se nos pontos de contato entre neurônios em migração e as fibras da glia radial do córtex cerebral (Elias et al., 2007). Alterações profundas no padrão de laminação cortical foram observadas em animais KO para a Cx43 (Fushiki et al., 2003). Os hemicanais de Cx43 fornecem pontos de apoio associados ao citoesqueleto para os neurônios em migração radial, permitindo a translocação do núcleo e o deslocamento neuronal (Elias et al., 2007). Além disso, a Cx43 estaria envolvida com o processo de migração tangencial de neurônios no córtex cerebral (Elias, 2010).

Durante o desenvolvimento cerebelar, fibras de orientação radial cruzam a ML. Essas fibras são processos de células da glia de Bergmann, cujos corpos celulares localizam-se na região das células de Purkinje (Altmann e Bayer, 1997). As células granulares atravessam a ML em seu processo de migração. Por isso, postulou-se que a migração de células granulares ocorreria por meio da glia de Bergmann (Rakic, 1971).

No entanto, diferentes autores não conseguiram mostrar células granulares migrando em associação à glia radial (Feirabend et al., 1990). Altmann e Bayer (1996) relataram que o contato

entre a glia radial e células granulares torna-se mais frequente em fases mais tardias do desenvolvimento cerebelar. Para esses autores, o aumento da densidade de processos na ML durante o desenvolvimento faria com que as células granulares migrassem juntas e em contato com a glia de Bergmann, como que aproveitando a rota provida por essas células.

Camundongos KO para a Cx43 apresentam desorganização do córtex cerebelar. Isso foi atribuído à ausência de formação de processos radiais pela glia de Bergmann (Wiencken-Barger et al., 2007). A glia de Bergmann de mamíferos adultos apresenta uma grande quantidade de JCs, onde a Cx43 foi detectada (Tanaka et al., 2008). No cerebelo em desenvolvimento, processos marcados por Cx43 e atribuídos à glia de Bergmann foram vistos por volta da segunda semana pós-natal (Yamamoto et al., 1992).

Neste trabalho, a Cx43 foi observada em processos da glia de Bergmann durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal. Especialmente por volta do nascimento, observamos células granulares em migração associadas a essas fibras. Até onde sabemos, nenhum trabalho mostrou a Cx43 em pontos de contato entre as células granulares em migração e a glia radial do cerebelo. Esse resultado sugere que a glia radial seja importante para a migração das células granulares por mecanismos relacionados à expressão de Cx43.

A migração celular requer a orquestração de diversos eventos moleculares, para os quais as pistas externas e o contato célula-célula parecem ser fundamentais (Elias et al., 2007). Diferentes moléculas e receptores foram descritos em células granulares em migração e nas fibras da glia de Bergmann (Yacubova e Komuro, 2003). Entretanto, os mecanismos que regulam a migração das células granulares ainda não são conhecidos. Assim como no córtex cerebral, os hemicanais de Cx43 poderiam funcionar como moléculas de adesão, fornecendo um ponto de ancoragem para as células granulares em migração.

Além disso, as células granulares apresentam elevações transientes da concentração intracelular de cálcio durante seu período de migração (Komuro e Kamada, 2005). Sabe-se que hemicanais de Cx43 estão relacionados à iniciação de ondas de cálcio em diferentes condições (Bennett et al., 2003). Portanto, a presença de Cx43 na glia radial do cerebelo poderia estar relacionada à iniciação de ondas de cálcio entre as células granulares. Uma questão interessante para pesquisas futuras seria investigar se existem diferenças funcionais entre as células granulares que migram em associação à glia radial e aquelas que migram sem suporte glial.

A glia radial desaparece em todas as regiões do SNC na vida adulta, com exceção da glia de Bergmann (Altmann e Bayer, 1997). No camundongo adulto, a glia de Bergmann expressa genes que aparecem especificamente em células-tronco, sugerindo que esse tipo de glia apresenta potencial para neurogênese (Koirala e Corfas, 2010). As células das zonas germinativas do SNC em desenvolvimento expressam Cx43, assim como a glia de Bergmann em animais adultos (Rozental et al., 2000; Tanaka et al., 2008). Portanto, a Cx43 constitui um fator comum entre células multipotentes, em diferentes fases da vida do animal. Seria interessante investigar se a Cx43 encontra-se em células relacionadas à neurogênese adulta em mamíferos e outras espécies.

5.1.2 A Cx43 e a formação das sinapses do córtex cerebelar

Nossos resultados sugerem que a expressão de Cx43 no córtex cerebelar de galinha começa por volta de E12. Além disso, o aumento da expressão de Cx43 ao longo do desenvolvimento cerebelar pode ser associado à maturação funcional de astrócitos. A presença de astrócitos foi associada à sinaptogênese em diferentes regiões do SNC (Buard et al, 2010). As primeiras sinapses do córtex cerebelar de galinha aparecem em E12 (Sepulveda et al., 2005). Sendo assim, mecanismos envolvendo a expressão de Cx43 poderiam estar associados à função dos astrócitos na formação de sinapses.

A necessidade de células da glia para a formação de sinapses depende do tipo de neurônio (Steinmetz et al., 2006). A ausência da glia afeta a diferenciação das células de Purkinje in vitro (Buard et al., 2010). Existem evidências de que a glia de Bergmann guia a formação de conexões inibitórias de interneurônios da ML com as células de Purkinje (Ango et al, 2008). Além disso, a ablação da glia de Bergmann resulta em alterações dramáticas na morfologia das células de Purkinje (Yamada e Watanabe, 2002).

As células de Purkinje são neurônios GABAérgicos, caracterizados por uma extensa árvore dendrítica e cujos axônios constituem a via de saída do córtex cerebelar (Tanaka, 2009; Ito, 2006). As células de Purkinje integram as informações provenientes de diferentes regiões do SNC. As fibras paralelas e as fibras trepadeiras constituem as aferências excitatórias das células de Purkinje (Ito, 2006).

As fibras da glia de Bergmann emitem ramos laterais na ML. Os microdomínios, a menor unidade das ramificações da glia de Bergmann, envolvem as sinapses glutamatérgicas formadas

pelas fibras paralelas nas células de Purkinje (Grosche et al., 1999). Os processos da glia de Bergmann apresentam transportadores de glutamato de alta afinidade do tipo GLAST, que controlam a concentração desse neurotransmissor na fenda sináptica (Lino et al., 2001). O revestimento pela glia de Bergmann começa cedo durante o desenvolvimento. À medida que há um aumento no número, comprimento e complexidade dos processos gliais, mais sinapses das células de Purkinje são envolvidas pela glia de Bergmann (Yamada e Watanabe, 2002).

Muitos estudos atribuem à glia de Bergmann um papel na formação da árvore dendrítica das células de Purkinje e estabilização de suas conexões sinápticas (Lordkipanidze e Dunaevsky, 2005). No cerebelo de ratos, o crescimento dos dendritos das células de Purkinje ocorre simultaneamente ao desenvolvimento dos ramos laterais da glia de Bergmann e em alinhamento com eles (Lordkipanidze e Dunaevsky, 2005; Buard et al., 2010).

Não se conhecem os mecanismos pelos quais a glia de Bergmann afeta o desenvolvimento das células de Purkinje. Alguns autores acreditam que seus processos forneceriam suporte estrutural para o desenvolvimento dos dendritos das células de Purkinje, o que seria mediado por moléculas de adesão (Lordkipanidze e Dunaevsky, 2005). Seria possível que a Cx43 presente na glia de Bergmann funcione como molécula de adesão, assim como ocorre na glia radial do neocórtex, fornecendo pontos de apoio para os dendritos das células de Purkinje.

Além disso, as JCs constituídas por Cx43 na glia de Bergmann poderiam fornecer um mecanismo de controle da concentração intracelular de cálcio. Com base em dados provenientes da literatura, seria possível que a concentração de cálcio na glia de Bergmann constitua um mecanismo de regulação da sinaptogênese e do crescimento dendrítico das células de Purkinje.

A concentração intracelular de cálcio na glia de Bergmann afeta a morfologia de seus processos (Lino et al., 2001). Em animais adultos, a retração dos processos da glia de Bergmann afeta funcionalmente as células de Purkinje. Isso ocorreria por que a distância entre os transportadores de glutamato e o local de liberação desse transmissor modifica a eficiência do processo de captação (Wenzel et al., 1991).

A liberação de glutamato nas sinapses nascentes influencia a formação de sinapses e o crescimento dendrítico (Yamada e Watanabe, 2002). Portanto, a sinaptogênese poderia ser afetada pela concentração extracelular de glutamato, a qual é controlada pelos transportadores da glia de Bergmann. De fato, o aparecimento dos transportadores de glutamato da glia de

Bergmann coincide com o início do desenvolvimento dos dendritos secundários das células de Purkinje (Lordkipanidze e Dunaevsky, 2005). Além disso, os processos da glia de Bergmann são muito móveis durante o desenvolvimento cerebelar (Buard et al., 2010).

O córtex cerebelar da galinha ao nascimento apresenta um padrão de organização muito semelhante ao do animal adulto (Feirabend et al., 1990). No período pós-natal, ocorre o refinamento dos circuitos neuronais em função da interação com o ambiente (Altmann e Bayer, 1997). A galinha nasce com uma capacidade funcional muito grande, principalmente se comparada aos mamíferos. Mesmo assim, a diversidade e eficiência de comportamentos aumentam bastante no período pós-natal (Carvalho et al., 2008). Entre P0 e P16, observamos um grande aumento na expressão de Cx43. Esse resultado sugere que a presença de Cx43 nos astrócitos relaciona-se à reorganização sináptica em função da experiência e à maturação funcional do cerebelo.

Entre P0 e P16, a imunorreatividade para a Cx43 aumenta na GL e diminui na ML. A GL constitui a camada de entrada do córtex cerebelar, por onde passam as fibras provenientes de outras regiões do SNC. Nessa camada, as informações trazidas pelas fibras musgosas são processadas antes de sua transmissão para as células de Purkinje (Ito, 2006). O aumento da Cx43 na GL sugere que a expressão dessa Cx seja importante para a maturação funcional dos circuitos cerebelares no período pós-natal. Na ML, em conjunto com a marcação menos intensa para a Cx43, observamos um menor número de fibras da glia de Bergmann em P16. Essas fibras são associadas à migração das células granulares. Possivelmente, ocorre uma eliminação de células da glia de Bergmann com o término dessa migração. Além disso, a árvore dendrítica das células de Purkinje apresenta o padrão adulto ainda antes do nascimento e a diferenciação dos interneurônios da ML termina no início do período pós-natal.

5.1.3 Expressão de conexina 43 em astrócitos no período pós-natal

O córtex cerebelar apresenta dois tipos de astrócitos: as células da glia de Bergmann e os astrócitos protoplasmáticos da GL (Hoogland e Kuhn, 2010). Além disso, na GL podem ser vistas longas fibras marcadas por GFAP, provavelmente provenientes de astócitos fibrosos da substância branca cerebelar (Altmann e Bayer, 1997). Os resultados dos experimentos de dupla-marcação com o GFAP indicam que a Cx43 está presente em todos os tipos de astrócitos do cerebelo.

Os astrócitos fornecem suporte estrutural para os neurônios, são fundamentais para o metabolismo neuronal e para a homeostase do meio extracelular (Perea e Araque, 2010). Os transportadores nos processos de astrócitos contribuem para o controle da quantidade de neurotransmissores na fenda sináptica e de seu tempo de contato com a região pós-sináptica, o que constitui um mecanismo importante para a precisão temporal das sinapses (Lino et al., 2001).

Entretanto, os astrócitos são mais do que células de suporte da atividade neuronal. Os astrócitos participam ativamente do processamento de informações nas sinapses químicas. Assim como os neurônios, os astrócitos apresentam uma forma de atividade elétrica. No caso dos astrócitos não existem potenciais de ação, mas variações na concentração intracelular de cálcio. Os astrócitos liberam substâncias neuroativas e apresentam receptores para neurotransmissores em suas membranas (Paixão e Klein, 2010).

De forma semelhante aos neurônios, os astrócitos podem apresentar uma espécie de campo receptivo e suas respostas serem específicas para diferentes estímulos sensoriais. No córtex visual, os astrócitos respondem seletivamente à orientação espacial dos estímulos (Piet e Jahr, 2007). Por fim, a resposta de astrócitos pode modificar-se em função de uma estimulação prévia. Até recentemente, a plasticidade era considerada uma propriedade exclusiva de neurônios (Perea e Araque, 2010).

Nas sinapses químicas, existe uma sinalização bidirecional entre neurônios e astrócitos. Os neurotransmissores liberados pelos neurônios ativam os receptores dos astrócitos. Muitos dos receptores nos processos dos astrócitos são metabotrópicos (Araque, 2009). Por meio de reações intracelulares, esses receptores podem causar a liberação do cálcio estocado na célula para o citoplasma (Perea e Araque, 2010). Além disso, o aumento da concentração intracelular de cálcio

nos astrócitos pode ocorrer diretamente pela entrada do íon proveniente do meio extracelular, como consequência da ativação de receptores ionotrópicos (Lino et al., 2001).

Os aumentos transientes da concentração de cálcio podem ser restritos ao corpo celular ou processos de um astrócito ou espalhar-se em forma de ondas entre astrócitos adjacentes (Metea e Newman, 2006). As ondas de cálcio podem se propagar a uma velocidade de micrometros por segundo e constituem uma possível forma de sinalização a longas distâncias no SNC (Scemes et al., 1998; Mercier e Hatton, 2001; Piet e Jahr, 2007). A sinalização por cálcio nos astrócitos encontra-se alterada em modelos experimentais de epilepsia ou como resultado da deposição de placas na doença de Alzheimer (Li et al., 2011).

As alterações na concentração de cálcio participam da regulação da morfologia celular e expressão gênica, além de poder desencadear a liberação de gliotransmissores (Perea et al., 2009). A liberação de moléculas neuroativas pelos astrócitos interfere no processamento de informação nas sinapses. O ATP pode causar inibição pré-sináptica em sinapses excitatórias (Zhang et al., 2003). Estudos mostram a influencia do glutamato e da D-serina liberados por astrócitos na plasticidade neuronal (Perea e Araque, 2007; Henneberger et al., 2010). Os astrócitos são ainda importantes na fisiologia do sono e parecem participar também da gênese de oscilações corticais (Fellin et al., 2009; Halassa et al., 2009).

Os astrócitos são extensamente conectados por JCs. Nos astrócitos, as JCs fornecem uma via de tamponamento espacial de metabólitos e íons K^+ provenientes da atividade neuronal (Perea et al., 2009). Além disso, as JCs associam-se à propagação de ondas de cálcio, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos, mas que parecem envolver a passagem de íons IP_3 pelos canais intercelulares (Araque, 2009). A passagem de moléculas e íons relacionados a sistemas de sinalização poderia coordenar a atividade em redes de astrócitos e, consequentemente, forneceria um mecanismo de controle da transmissão sináptica entre grupos de neurônios distantes um do outro (Hallassa et al., 2007).

A maioria dos estudos sobre a participação de astrócitos na transmissão sináptica realizou-se em tecidos como o córtex cerebral, hipocampo e retina (Hallassa et al., 2007; Bernardinelli et al., 2011). Apenas recentemente, o papel dos astrócitos no córtex cerebelar começou a ser estudado, com foco nas células da glia de Bergmann.

As células da glia de Bergmann constituem o único tipo de astrócitos da ML. Em ratos e camundongos, a glia de Bergmann apresenta grande quantidade de JCs e de Cx43 (Tanaka,

2008). Curiosamente, a Cx29 aparece também na glia de Bergmann de camundongos, apesar de ser uma isoforma típica de oligodendrócitos e células de Schwann (Eiberger et al., 2006). Na ML do cerebelo de galinha, observamos a Cx43 nas fibras da glia de Bergmann e no que parecem ser seus ramos laterais. Além disso, uma alta densidade de Cx43 foi observada abaixo e entre as células de Purkinje, local onde se localizam os corpos celulares das células da glia de Bergmann (Altamann e Bayer, 1996).

A glia de Bergmann envolve as sinapses das células de Purkinje, a única fonte das projeções de saída do córtex cerebelar (Altamann e Bayer, 1997). Os ramos laterais da glia de Bergmann, que partem das fibras principais, compartimentalizam as sinapses das células de Purkinje com fibras trepadeiras, fibras paralelas e interneurônios inibitórios da ML. Essa proximidade entre os processos da glia de Bergmann e sinapses da ML sugere que eles interajam funcionalmente. De fato, as informações disponíveis até momento sugerem que a glia de Bergmann apresenta um papel na modulação das sinapses da ML (Lino et al., 2001; Hoogland e Kuhn, 2010). Além disso, o acoplamento das células da glia de Bergmann poderia fornecer uma via de contato entre sinapses isoladas por seus ramos laterais e um mecanismo de integração da atividade sináptica no córtex cerebelar.

Os processos da glia de Bergmann que envolvem as sinapses excitatórias das células de Purkinje apresentam grande densidade de receptores de glutamato ionotrópicos do tipo AMPA. Nas sinapses entre interneurônios inibitórios da ML e células de Purkinje, os processos da glia de Bergmann apresentam receptores de GABA do tipo GABA_A. Acredita-se que os receptores do tipo AMPA e GABA_A mediam a função da glia de Bergmann como uma espécie de sensor da transmissão sináptica excitatória ou inibitória da ML do córtex cerebelar (Hoogland e Kuhn, 2010).

A diminuição da permeabilidade ao cálcio nos receptores do tipo AMPA causa retração dos processos da glia de Bergmann, enquanto o aumento da expressão de receptores AMPA causa a sua extensão. A posição dos processos da glia de Bergmann afeta a resposta das células de Purkinje à estimulação das fibras paralelas e trepadeiras. Essa alteração é atribuída à maior distância entre os transportadores de glutamato do tipo GLAST dos processos da glia de Bergmann e as células de Purkinje e da consequente diminuição da eficiência na recaptação de glutamato (Lino et al., 2001).

Aumentos intracelulares da concentração de cálcio na glia de Bergmann foram obtidos pela aplicação substâncias como a histamina, noradrenalina e ATP e glutamato (Piet e Jahr, 2007). Essas moléculas mobilizam de estoques intracelulares de cálcio, por meio da ativação de receptores metabotrópicos (Hoogland et al., 2009). Assim como astrócitos de outras regiões dos SNC, a glia de Bergmann apresenta ondas de cálcio espontâneas ou em função da atividade sináptica. As ondas de cálcio espontâneas na glia de Bergmann in vivo podem ser bloqueadas pelos receptores do tipo P2Y. De modo similar, a injeção de ATP pode engatilhar ondas de cálcio em processos da glia de Bergmann (Hoogland et al., 2009).

Os astrócitos protoplasmáticos da GL apresentam uma aparência estrelada e processos que envolvem os glomérulos (Altmann e Bayer, 1997). Ondas de cálcio foram observadas nesses astrócitos na presença de ATP (Hoogland et al., 2009). No rato, a Cx43 e Cx30 foram observadas em astrócitos na GL (Koster-Patzlaff et al., 2008a). Neste trabalho, observamos uma grande quantidade de Cx43 na GL, extensamente co-localizada com processos marcados por GFAP. Portanto, nossos resultados indicam que astrócitos da GL do córtex cerebelar da galinha apresentam Cx43. Entre os núcleos das células da GL, podem ser vistos círculos desenhados pela marcação puntiforme da Cx43. Provavelmente, essas estruturas são formadas por processos de astrócitos delimitando os glomérulos e marcados por Cx43.

Os glomérulos são estruturas complexas com múltiplas sinapses, localizados entre os corpos celulares da GL (Altmann e Bayer, 1997). Cada glomérulo apresenta uma fibra musgosa em seu centro, dezenas de dendritos de diferentes células granulares, terminais axônicos e dendritos basais de células de Golgi (Altmann e Bayer, 1997; Galiano et al., 2010). Nos glomérulos, as sinapses excitatórias glutamatérgicas das fibras musgosas contatam os dendritos de células granulares. Na mesma região, formam-se as sinapses inibitórias GABAérgicas das células de Golgi (Altmann e Bayer, 1997).

Não se sabe como o revestimento por astrócitos influencia o processamento de informação nos glomérulos. Os astrócitos poderiam afetar a transmissão sináptica nos glomérulos por meio da recaptação de neurotransmissores ou pela liberação de gliotransmissores. Além disso, a comunicação de processos de astrócitos por meios de JCs poderia fornecer uma forma de interação entre glomérulos vizinhos.

Nas sinapses químicas, existem diversos mecanismos que permitem o controle do tempo de permanência dos neurotransmissores na fenda sináptica, como a degradação por enzimas e a

presença de transportadores. Em geral, a difusão de neurotransmissores para a fora da fenda sináptica é associada à perda de especificidade na transmissão de informações (Otis et al., 2002). Nos glomérulos cerebelares, o extravasamento de neurotransmissores constitui um mecanismo importante na transmissão e processamento das informações que chegam ao córtex cerebelar (Otis, 2002; Ito, 2006).

Em cada glomérulo, o glutamato liberado pela fibra musgosa difunde-se e acaba por ativar receptores do tipo AMPA, NMDA e mGluR localizados em processos de diferentes células (Otis et al., 2002). O GABA liberado pelas células de Golgi estimula receptores ionotrópicos do tipo GABA_A nas membranas pós-sinápticas das células granulares. Em locais extra-sinápticos, as células granulares apresentam receptores do tipo GABA_B, que exercem uma ação inibitória mais forte e prolongada nas células granulares (Nusser et al, 1995; Brickley et al., 1996; Ito, 2006). Essa importância da difusão e extravasamento de neurotransmissores, assim como a abundância de receptores extra-sinápticos, sugere que os transportadores localizados em astrócitos e a gliotransmissão podem ter um papel mais complexo nos glomérulos do que em outras regiões do SNC.

Neste trabalho, realizamos experimentos de dupla-marcação de modo avaliar a presença da Cx43 em neurônios e oligodendrócitos. A Cx43 foi descrita em algumas populações de neurônios do encéfalo de ratos (Alvarez-Maubecin et al., 2000). Além disso, o acoplamento entre células de Purkinje e a glia de Bergman foi descrito no cerebelo (Pakhotin e Verkhratsky, 2005). Neste, estudo utilizamos a calbindina e o PAN para marcar neurônios do córtex cerebelar.

A calbindina marca processos e corpos celulares de células de Purkinje. Observamos muitos pontos imunorreativos para a Cx43 na ML, na proximidade de dendritos marcados por calbindina. A Cx43 não parece localizar-se nos dendritos das células de Purkinje, mas em torno deles. Provavelmente, a Cx43 encontra-se nos ramos laterais da glia de Bergmann que envolvem as sinapses das células de Purkinje.

Na GL, observamos pontos imunorreativos para a Cx43 na superfície de axônios marcados por PAN. Esses resultados sugerem a existência de JCs formadas por Cx43 acoplando astrócitos a neurônios no córtex cerebelar. A existência de JCs entre neurônios e astrócitos foi descrita por Nedergaard (1994), que observou a propagação de ondas de cálcio entre astrócitos e neurônios in vitro. Posteriormente, foi descrita a transferência de traçadores e passagem de correntes entre astrócitos e neurônios (Froes et al., 1999). JCs comunicando processos de

astrócitos a neurônios adjacentes foram identificadas no córtex cerebral (Nadarajah et al., 1996). O papel funcional do acoplamento entre neurônios e astrócitos ainda é desconhecido. No entanto, a existência desse tipo de interação adiciona complexidade ao processamento de informação no sistema nervoso.

As JCs entre astrócitos e oligodendrócitos são comuns no sistema nervoso (Magnotti et al., 2011b). Os canais intercelulares entre astrócitos e oligodendrócitos são heterotípicos. Os hemicanais localizados na membrana do astrócitos são constituídos em geral por Cx43 e Cx30. Nos oligodendrócitos, os hemicanais apresentam Cx32 e Cx47 (Nagy e Rash, 2000; Nagy et al., 2003). Geralmente, JCs entre astrócitos e oligodendrócitos são associadas ao papel dos astrócitos no suporte metabólico (Nagy e Rash, 2000). Entretanto, as funções dessas JCs são provavelmente mais complexas que isso, já que a ausência dessas JCs causa a morte tanto de astrócitos quanto de oligodendrócitos (Magnotti et al., 2011a). Além disso, estudos recentes mostraram a passagem de ondas de cálcio entre astrócitos e oligodendrócitos (Orthman-Murphy, 2008).

5.2 CONEXINA 36

Neste trabalho, observamos um aumento da expressão gênica e dos níveis protéicos de Cx36 no cerebelo de galinha durante o período embrionário. O aumento da expressão de Cx36 ao longo do desenvolvimento foi observado também na retina de galinha (Kihara et al., 2009), na retina de camundongos (Kihara et al., 2006) e em diferentes regiões do SNC de ratos (Belluardo et al, 2000; Condorelli et al, 2000). No diencéfalo, hipocampo e córtex cerebral, a expressão de Cx36 aumenta durante as suas primeiras semanas pós-natais, diminuindo subsequentemente (Belluardo et al., 2000).

No início do desenvolvimento, os neurônios são intensamente acoplados por JCs. O acoplamento neuronal diminui à medida que as sinapses químicas aparecem (Bruzzone e Dermietzel, 2006; Yuste et al., 1992). Acredita-se que a Cx36 esteja envolvida em grande parte desse acoplamento, já que foi identificada em precursores neuronais e neurônios imaturos em diversas áreas do SNC (Belluardo et al., 2000; Hartfield et al., 2011; Rozental et al., 2000). Acredita-se a Cx36 participe de mecanismos envolvidos com a formação de circuitos neuronais (Belluardo et al., 2000; Bruzzone e Dermietzel, 2006).

No córtex cerebelar da galinha, a diferenciação de todos os tipos celulares ocorre durante o estágio embrionário. Logo após o nascimento, as conexões sinápticas do córtex cerebelar encontram-se completamente formadas (Sepulveda et al, 2005; Mecha et al., 2010). Portanto, o aumento de Cx36 durante o período embrionário pode estar associado à formação de circuitos neuronais. Além disso, por volta de E18, inicia-se um período de intensa sinaptogênese no córtex cerebelar de galinha (Feirabend et al., 1990). Nesse estágio de desenvolvimento, as fibras paralelas formam sinapses na ML e os interneurônios inibitórios dessa camada encontram-se em fase final de diferenciação (Altmann e Bayer, 1997). Em E18, observamos uma forte imunorreatividade para a Cx36 na ML. Essa alta expressão de Cx36 pode, pelo menos em parte, relacionar-se à formação de circuitos neuronais.

Neste trabalho, o nível proteico de Cx36 no cerebelo foi maior em P16 que em P0. Entretanto, não se observaram diferenças entre a quantidade de RNAm em P16 e P0. Sendo assim, parece que a expressão gênica de Cx36 estabiliza-se no período pós-natal, quando os circuitos do córtex cerebelar da galinha já foram constituídos. Portanto, o aumento na síntese de Cx36 após o nascimento pode ser atribuído a mecanismos pós-transcripcionais. A observação de

maiores níveis de Cx36 na ausência de um aumento na quantidade de RNAm já havia sido relatada em trabalhos anteriores (Aberg et al., 1999; Song et al., 2012).

No córtex cerebelar de ratos, a expressão gênica de Cx36 em P1 e em P21 foi comparada por meio de RT-PCR e pela contagem do número de células expressando o RNAm (Van der Giessen et al., 2006). Os resultados desse estudo sugerem que a expressão da Cx36 diminui no período pós-natal. No entanto, a comparação apenas entre P1 e P21 não permite avaliar se houve um pico na expressão de Cx36 no córtex cerebelar nas duas primeiras semanas pós-natais, assim como acontece em outras regiões do encéfalo de ratos. Em outro estudo, avaliou-se a imunorreatividade para a Cx36 no córtex cerebelar de ratos com quatro e oito semanas pós-natais. Nesse caso, os resultados mostraram um aumento de Cx36 no período pós-natal (Koster-Patzlaff et al., 2008). Uma possibilidade para explicar os resultados contraditórios desses dois trabalhos seria que a expressão da Cx36 no córtex cerebelar de ratos diminui entre o nascimento e três semanas pós-natais, mas torna a aumentar após esse período.

Ao nascimento, ratos apresentam limitada capacidade de locomoção. Nas primeiras semanas de desenvolvimento pós-natal, esses animais desenvolvem a capacidade de correr, escalar e pular. Esse aumento na capacidade motora pode ser relacionado ao desenvolvimento cerebelar (Altmann e Bayer, 1997). No início do período pós-natal, o córtex cerebelar de ratos apresenta apenas a ICCL, onde se localizam células de Purkinje, e uma fina EGL. O padrão de foliação é simples, com poucas fissuras, e os interneurônios inibitórios ainda não começaram a diferenciação (Altmann e Bayer, 1997). Esse estágio de desenvolvimento equivale àquele observado por volta de E12 no cerebelo de galinha (Feirabend et al., 1990).

Por volta de P21, a EGL desaparece e todos os tipos celulares do córtex cerebelar de ratos já se diferenciaram. Nessa fase inicia-se um período sem grandes alterações morfológicas, mas de intensa organização sináptica e amadurecimento dos circuitos cerebelares (Altmann e Bayer, 1997). Nesse período, o córtex cerebelar de ratos encontra-se no mesmo grau de desenvolvimento observado na galinha por volta do nascimento (Feirabend et al., 1990; Mecha et al., 2010).

Se considerarmos as características histológicas do córtex cerebelar, nossos resultados indicam que houve um aumento na expressão de Cx36 em um período (E12-P0) equivalente àquele no qual Van der Giessen et al. (2006) encontraram uma diminuição de sua expressão (P1-P21). No período de maturação dos circuitos cerebelares, que ocorre a partir de P0 na galinha e

de P21 no rato, observamos um aumento nos níveis protéicos de Cx36. Similarmente, entre quatro e oito semanas pós-natais foi observado um aumento na imunorreatividade para a Cx36 no cerebelo de ratos (Koster-Patzlaff et al., 2008). Análises mais detalhadas da expressão de Cx36 no córtex cerebelar de ratos são necessárias para avaliar a existência de diferenças entre espécies.

5.2.1 A Cx36 associa-se a células granulares em diferenciação

Durante o desenvolvimento, o cerebelo cresce e adquire um padrão complexo de foliação. As mudanças pelas quais o cerebelo passa durante seu processo de histogênese são atribuídas, principalmente, à proliferação dos precursores de células granulares e sua migração para a GL (Altmann e Bayer, 1997; Sepulveda et al., 2005).

Os precursores de células granulares localizam-se na EGL, que ocupa a região mais externa do córtex cerebelar. As células da EGL param de se dividir gradativamente e as células pós-mitóticas acumulam-se em sua região mais inferior, antes de iniciarem seu processo de migração. As células granulares migram pela ML e IGL. Na IGL, as células granulares passam pela sua fase final de diferenciação (Feirabend et al., 1990; Sepulveda et al., 2005). No córtex cerebelar de ratos em P7, a expressão da Cx36 foi observada por hibridização in situ na ML e na IGL, mas não na EGL (Belluardo et al., 2000). Neste trabalho, encontramos a Cx36 em todas as camadas do córtex cerebelar embrionário, incluindo a EGL. Nossos resultados sugerem que a Cx36 está associada a células granulares em seus diversos estágios de diferenciação, desde a proliferação de seus precursores.

No córtex cerebelar de galinha em E14, a presença de Cx36 foi encontrada em toda a extensão da EGL. Nesse estágio, a EGL apresenta células em proliferação em sua região externa e células pós-mitóticas em sua área mais interna (Sepulveda et al., 2005). A observação de Cx36 na região externa da EGL de E14 sugere que essa Cx esteja presente em precursores de células granulares em proliferação.

A Cx36 foi detectada em áreas de neurogênese no encéfalo de camundongos (Gulisano et al., 2000) e em células-tronco e precursores neuronais em humanos (Huettnner et al., 2006). Recentemente, Hartifield et al. (2011) mostraram que a ausência da Cx36 em precursores neuronais mantidos em cultura diminui o número de neurônios e aumenta o número de células

gliais. Esses resultados sugerem que a Cx36 presente em precursores neuronais relaciona-se aos mecanismos que controlam o destino de células em proliferação. A Cx36 presente na EGL pode ter uma função semelhante na formação de células granulares.

Nos experimentos de imuno-histoquímica, observamos a Cx36 em torno de grupos de células granulares em migração na ML e em processos provenientes dessas células. Além disso, a intensidade da marcação de Cx36 parece variar com a região do córtex cerebelar. De E14 a E18, a imunorreatividade para a Cx36 foi mais intensa na porção inferior da EGL que na região mais externa dessa camada. Em E18, observamos uma marcação mais forte de Cx36 na ML que nas outras camadas do córtex cerebelar. Na PCL de E18, a marcação de Cx36 é mais fraca que nas regiões adjacentes na IGL e na ML.

O processo de migração das células granulares é bastante dinâmico. No trajeto da EGL para a IGL observam-se alterações na velocidade, direção e modo de migração, assim como transformações na morfologia das células granulares (Komuro et al. 2001; Komuro e Kamada, 2005). Diferentes grupos de moléculas e receptores potencialmente relacionados à migração das células granulares já foram identificados. Vários deles associam-se a mecanismos de sinalização envolvendo cálcio (Yacubova e Komuro, 2003).

As células granulares apresentam elevações transientes da concentração intracelular de cálcio (Spitzer, 2006). A intensidade dos transientes de cálcio relaciona-se à velocidade de migração das células granulares. Quanto maior a concentração intracelular de cálcio, mais rapidamente essas células se movimentam (Komuro e Kumada, 2005). Esses transientes de cálcio foram observados já em células em proliferação na região superior da EGL. A amplitude e frequência dos transientes de cálcio varia com a região do córtex cerebelar (Komuro H, Rakic, 1995).

Na parte inferior da EGL, onde as células granulares migram tangencialmente, esses transientes de cálcio tornam-se mais frequentes (Komuro et al. 2001). Quando as células granulares entram na ML, a concentração intracelular de cálcio atinge níveis mais elevados. Na proximidade das células de Purkinje, os transientes de cálcio tornam-se menos frequentes e apresentam menor amplitude. No início da migração na IGL, a frequência dos transientes de cálcio aumenta. As alterações transientes da concentração intracelular de cálcio desaparecem com o fim da migração das células granulares e início da fase final de diferenciação (Komuro e Kumada, 2005).

Existem evidências de que mecanismos de sinalização envolvendo cálcio são fundamentais em várias etapas do desenvolvimento (Weissman et al., 2004; Hettiarachi et al. 2010; Belgacem et al., 2011). O cálcio pode estar associado à regulação de processos envolvidos com a migração e diferenciação das células granulares.

A propagação de ondas de cálcio entre grupos de células acopladas por JCs pode ser vista em diferentes etapas do desenvolvimento do sistema nervoso (Bennett et al., 2003). Em períodos mais tardios do desenvolvimento, acredita-se que as ondas de cálcio sejam importantes para a associação funcional entre grupos de neurônios (Klander e Katz, 1998). Acredita-se que a Cx36 esteja envolvida com grande parte desse acoplamento entre neurônios imaturos (Park et al., 2011). Além disso, a Cx36 associa-se a aumentos das concentrações intracelulares de cálcio em células de outras regiões do organismo, como nas células beta do pâncreas (Benninger et al., 2008).

Sendo assim, é provável que a Cx36 esteja envolvida com os aumentos transientes nos níveis cálcio nas células granulares e a propagação de ondas de cálcio entre elas por meio da formação de JCs. Seria interessante investigar se a Cx36 e a Cx43 estão realmente envolvidas com ondas de cálcio entre células granulares e o papel dessas Cxs nos processos de migração e diferenciação das células granulares.

5.2.2 A Cx36 no córtex cerebelar pós-natal

Neste trabalho, avaliamos a localização da Cx36 no córtex cerebelar por meio da técnica de imuno-histoquímica. Em P16, uma forte imunorreatividade para a Cx36 foi observada na GL. Além disso, uma marcação fraca foi observada na ML e na PCL. Nos experimentos de dupla-marcação, observamos um alto grau de co-localização entre a Cx36 e dendritos marcados por MAP2.

A Cx36 é observada em neurônios em diversas espécies e apresenta estrutura e propriedades funcionais conservadas filogeneticamente (Gonzalez-Nieto et al., 2008). No sistema nervoso da galinha, a Cx36 foi descrita apenas na retina (Kihara et al., 2009). No córtex cerebelar de ratos, o RNAm da Cx36 foi observado principalmente no terço inferior da ML, provavelmente em células em cesto, e nas células de Golgi da GL (Belluardo et al., 2000; Condorelli et al., 2000). Recentemente, a Cx36 foi identificada nos pontos de contato entre dendritos das células de Golgi, marcados para mGluR2/3 (Vervaeke et al., 2010).

No córtex cerebelar de galinha, observamos que existe uma grande similaridade entre a distribuição espacial da Cx36 e do mGluR2/3. Nos experimentos de dupla-marcação, utilizamos a cor verde para a Cx36 e a cor vermelha para o mGluR2/3. Nessas condições, quando imagens da marcação de Cx36 são sobrepostas às de mGluR2/3 é provável que as áreas onde as duas proteínas foram marcadas apareçam em amarelo. Com a sobreposição da marcação de Cx36 e de mGluR2/3, a cor amarela não é vista em muitas regiões. No entanto, especialmente em aumentos maiores, a marcação da Cx36 e do mGluR2/3 são vistas lado a lado, e claramente estão localizadas nas mesmas estruturas celulares.

No cerebelo de ratos, o mGluR2/3 localiza-se nos corpos celulares, axônios e, principalmente, nos dendritos de células de Golgi (Ohishi et al., 1994). As células de Golgi conectam-se umas às outras exclusivamente por sinapses elétricas (Vervaeke et al., 2010). Essas células apresentam dendritos apicais, que se orientam na direção da superfície cerebelar, e dendritos basais, orientados para o interior da GL. Os corpos das células de Golgi estão localizados em toda a extensão da GL, mas concentram-se na proximidade da PCL. Existe uma grande quantidade de dendritos apicais das células de Golgi que atravessam a PCL e alcançam a ML (Altmann e Bayer, 1997).

No córtex cerebelar de galinha, observamos um alto grau de co-localização entre mGluR2/3 e MAP2. A marcação de mGluR2/3 foi concentrada na GL, assim como a da Cx36. Na ML, observamos processos marcados pelo mGluR2/3 principalmente no terço inferior da ML, onde situam-se os dendritos apicais das células de Golgi. Portanto, nossos resultados indicam que o mGluR2/3 localiza-se principalmente em dendritos das células de Golgi no córtex cerebelar de galinha, assim como em ratos. Sendo assim, a Cx36 localiza-se principalmente em dendritos de células da GL do córtex cerebelar da galinha, provavelmente em células de Golgi.

Apesar dessas similaridades em relação ao tipo celular que expressa Cx36, existem diferenças na distribuição dessa Cx no córtex cerebelar de ratos e de galinha. A marcação para a Cx36 aparece principalmente na ML do córtex cerebelar de ratos (Belluardo et al., 2000; Vervaeke et al., 2010), enquanto na galinha essa Cx está concentrada na GL. Possivelmente, outra proteína de JCs forma sinapses elétricas entre os interneurônios inibitórios da ML do córtex cerebelar de galinha.

Nossos resultados indicam que existe Cx36 em células de Golgi, mas não excluem a possibilidade da presença de Cx36 também em dendritos de células granulares. As células granulares estão presentes em toda a GL, constituem o tipo celular mais numeroso do cerebelo e apresentam muitos dendritos (Altmann e Bayer, 1997). Nas células granulares do cerebelo de galinha, já foi identificada a Cx39 (Nicotra et al., 2004). A Cx39 foi isolada do tubo neural de embriões de galinha e encontrada em fibras musculares estriadas de camundongos em desenvolvimento, mas ainda não foi observada no SNC de mamíferos (Cicirata et al., 2004; von Maltzahn et al., 2004). Nenhuma proteína de JCs foi até agora identificada nas células granulares de mamíferos.

Em P0, o córtex cerebelar de galinha apresenta o padrão de camadas dos animais adultos, com exceção dos resquícios de EGL visto em algumas regiões. Assim como em P16, observamos em P0 uma maior expressão de Cx36 na GL em comparação à ML e PCL. No entanto, a imunorreatividade para a Cx36 na GL é maior em P16 que em P0. Além disso, em P0 uma região de maior densidade de Cx36 pode ser vista em torno de grupos de células granulares em migração. Nos experimentos de Western blotting, encontramos um maior nível proteico de Cx36 em P16 que em P0. Possivelmente, essa diferença se deve à maior quantidade de Cx36 na GL de P16.

5.2.3 A Cx36 e o mGluR2/3 no córtex cerebelar

Por meio de experimentos de dupla-marcação, observamos uma grande similaridade entre a distribuição espacial de Cx36 e mGluR2/3 no córtex cerebelar, no período embrionário e no pós-natal. Em E18, existe co-localização entre Cx36 e mGluR2/3 principalmente em faixas verticais na ML e na região superior dessa camada, em torno de grupos de células granulares em migração. No córtex cerebelar de P16, observamos a Cx36 em dendritos de células de Golgi marcados pelo mGluR2/3. A proximidade entre a Cx36 e o mGluR2/3 sugere que essas proteínas estejam relacionadas funcionalmente em diferentes estágios de desenvolvimento cerebelar.

Diferentes exemplos de interação entre o neurotransmissor glutamato e as JCs foram descritos no sistema nervoso em desenvolvimento. Por exemplo, o glutamato liberado nas sinapses nascentes diminui o acoplamento entre neurônios por meio de receptores do tipo NMDA (Arumugam et al., 2005). Park et al., (2011) observaram que a ativação de mGluRs do grupo II (mGluR2 e o mGluR3) aumenta o acoplamento celular e a expressão de Cx36 em culturas de hipotálamo e de córtex cerebral coletados de ratos recém-nascidos. A inativação dos mGluRs do grupo II diminui o acoplamento e a expressão de Cx36. Sendo assim, é possível que o mGluR2/3 esteja envolvido com os mecanismos que regulam a expressão de Cx36 em células granulares durante o desenvolvimento cerebelar.

Além disso, a ativação do mGluR2/3 poderia estar envolvida com a expressão de Cx36 nas células de Golgi em diferenciação. A ativação desse receptor seria proveniente das aferências glutamatérgicas das fibras musgosas, as quais terminam de formar as conexões com as células de Golgi por volta de E19 (Sepulveda et al., 2005). A imunoreatividade para o mGluR2/3 foi observada já na IGL de E18. Nesse estágio, seu padrão de marcação é muito semelhante àquele visto na GL de P16. Por outro lado, a imunoreatividade para a Cx36 na GL aumenta muito após E18, inclusive no período de P0 a P16. Portanto, a expressão de mgluR2/3 nas células de Golgi parece anteceder a de Cx36. A ativação aguda de mGluRs do grupo II em cultura aumenta a quantidade de Cx36 por mecanismos pós-transcricionais (Song et al., 2012). Similarmente, no período pós-natal do desenvolvimento de galinha, observamos um aumento dos níveis protéicos de Cx36, mas sem uma alteração correspondente do RNAm.

Nossos resultados sugerem que as células granulares em diferenciação apresentam Cx36. No entanto, a Cx36 encontra-se provavelmente em células de Golgi e não em células granulares na GL de P16. Além disso, a Cx36 também não foi observada em células granulares diferenciadas de ratos (Belluardo et al., 2000). Portanto, as células granulares parecem deixar de expressar a Cx36 em seu processo de diferenciação. Se isso acontece, resta saber que mecanismos fazem com que a Cx36 não seja mais expressa nas células granulares.

Uma alternativa seria a ativação de receptores do tipo GABA_A. Em experimentos em cultura de células, a ativação de receptores do tipo GABA_A apresenta efeitos inversos à estimulação do mGluR2/3, causando diminuição do acoplamento neuronal e da expressão de Cx36 (Park et al., 2011). Nos glomérulos, as células granulares apresentam uma grande densidade de receptores do tipo GABA_A, os quais são ativados pelo GABA liberado pelas células de Golgi. O início da atividade GABAérgica das células de Golgi e a consequente ativação dos receptores GABA_A das células granulares poderiam ser parte dos mecanismos que regulam a expressão de Cx36 durante a diferenciação das células granulares.

No cerebelo adulto, a possibilidade de regulação da expressão de Cx36 por meio de receptores mGluR2/3 pode ter importantes repercussões funcionais. As células de Golgi recebem aferências glutamatérgicas das fibras musgosas e das fibras paralelas. As primeiras conectam o corpo celular e dendritos descendentes das células de Golgi, enquanto as fibras paralelas fazem sinapses em seus dendritos apicais na ML (Vervaeke et al., 2010).

Nos glomérulos encontram-se as sinapses entre as fibras musgosas e as células granulares, além de axônios e dendritos basais das células de Golgi. As células de Golgi inibem fortemente as células granulares, diminuindo sua responsividade às aferências glutamatérgicas das fibras musgosas. As células de Golgi apresentam um exuberante plexo axonal com ampla extensão lateral e que pode influenciar milhares de células granulares (Heine et al., 2010).

A estimulação direta de fibras musgosas ou paralelas (Vervaeke, 2010) ou a estimulação tátil da face (Vos et al., 1999), vibrissas e membros (Holtzman et al., 2006) gera respostas das células de Golgi. Um elemento comum a essas respostas consiste em um período silente após uma sequência de disparos (Heine et al., 2010). Essa pausa parece ser gerada pela ativação de receptores do tipo mGluR2, que hiperpolariza as células de Golgi por meio da abertura de canais de K⁺ (Vervaeke, 2010).

As células de Golgi são acopladas umas às outras por sinapses elétricas que favorecem a passagem de correntes hiperpolarizantes (Vervaeke et al., 2010). Portanto, a inibição de uma célula de Golgi pode inibir também as células com que está acoplada. A comunicação entre as células de Golgi por sinapses elétricas fornece um mecanismo de coordenação espacial na GL das respostas às informações provenientes de fora do córtex cerebelar (Watanabe e Nakanishi, 2003; Heine et al, 2010). A Cx36 foi observada nos dendritos das células de Golgi e, provavelmente é a que forma as sinapses elétricas entre essas células (Vervaeke et al., 2010). A regulação da passagem de corrente pelas sinapses elétricas teria consequências para o funcionamento cerebelar e poderia ser realizada por mecanismos envolvendo os efeitos do mGluR2 na expressão de Cx36.

A inibição das células granulares limita a transferência de informação para as células da ML (Galliano et al, 2010). As sinapses das células de Golgi com as células granulares funcionam como uma espécie de filtro espaço-temporal, controlando dinamicamente a ativação das células de Purkinje pelas fibras paralelas (Vervaeke et al., 2010). A ativação dos receptores mGluR2 ou a passagem de correntes hiperpolarizantes de uma célula a outra aumenta a excitabilidade das células granulares e, portanto, a transferência de informação para a ML (Watanabe e Nakanishi, 2003).

Mecanismos de regulação funcional no SNC envolvendo a Cx36 já foram descritos. Na retina, a liberação de dopamina diminui o acoplamento via JCs entre as células horizontais pela fosforilação da Cx36 presente nas células AII (Bloomfield e Völgyi, 2009; Kothmann et al., 2009). Isso causa uma diminuição do campo receptivo dessas células, já que as células amácrinas passam a responder a um número menor de fotorreceptores. Como consequência funcional, ocorre um aumento na sensibilidade ao contraste (Xin e Bloomfield, 1999).

5.2.4 Sinapses elétricas no córtex cerebelar

As sinapses elétricas foram descritas em diferentes áreas do SNC (Bennett, 1997; Bennett, 2000). No cerebelo de ratos, as sinapses elétricas foram descritas entre os interneurônios inibitórios da ML (Sotelo e Lhinás, 1972; Mann-Metzer e Yarom, 1999) e nas células de Golgi (Galliano, 2010).

Nas sinapses elétricas, a passagem de corrente de uma célula para outra é proporcional à diferença de potencial entre elas. Os potenciais de membrana de células acopladas tende a se

igualar, deixando-as igualmente hiperpolarizadas ou despolarizadas. Neste último caso, a probabilidade de disparos sincrônicos de grupos de neurônios acoplados aumenta (Bennett, 2000; Galarreta e Hestrin, 2001; Vervaeke et al., 2010). Acredita-se que a sincronização produzida por sinapses elétricas esteja envolvida na geração das oscilações rítmicas da atividade elétrica observadas em circuitos neuronais (Vervaeke et al., 2010). As oscilações estariam relacionadas a importantes funções motoras e cognitivas. Além disso, observam-se alterações nessas oscilações em distúrbios psiquiátricos como a esquizofrenia (Uhlhaas e Singer, 2010).

As oscilações em redes neuronais podem ser medidas pelo eletroencefalograma (EEG) e apresentadas em forma de ondas com diferentes amplitudes e frequências. As flutuações nas voltagens nos potenciais de membrana de uma população de neurônios geram campos elétricos extracelulares, que podem ser medidos e amplificados pelos eletrodos do EEG. A medida do EEG reflete, principalmente, os potenciais pós-sinápticos excitatórios (PEPS) e inibitórios (PIPs) em células pós-sinápticas (Courtemanche e Lamarre, 2005; Courtemanche et al., 2009; Michel e Murray, 2012).

Os diferentes padrões de atividade no sistema nervoso são frequentemente denominados ritmos. Diferentes ritmos associam-se especificamente a certos comportamentos e processos cognitivos. Por exemplo, o ritmo alfa pode ser observado em pessoas de olhos fechados e caracteriza-se pela presença de ondas de grande amplitude e frequência de cerca de 10 Hz (Courtemanche e Lamarre, 2005; Uhlhaas e Singer, 2010).

As oscilações em redes neuronais foram observadas em diferentes regiões do SNC, incluindo o hipocampo, tálamo, córtex cerebral e cerebelo (Duguè et al., 2009; Uhlhaas et al., 2010; Zhang et al., 2011). Provavelmente, diferentes mecanismos estão envolvidos na geração dessas oscilações (Uhlhaas e Singer, 2010). No entanto, acredita-se que circuitos de interneurônios inibitórios conectados por JCs apresentam um papel fundamental na gênese dessas oscilações (Galarreta e Hestrin, 2001).

Na maioria das regiões em que foi identificada, a Cx36 localiza-se em interneurônios inibitórios, incluindo o córtex cerebral (Venance et al., 2000; Galarreta e Hestrin, 2002), hipocampo (Venance et al., 2000; Allen et al., 2011), estriado (Koós e Tepper, 1999), tálamo (Landisman et al., 2002) e cerebelo (Vervaeke et al., 2010). Em camundongos KO para a Cx36, ocorrem alterações nas oscilações do tipo gama (30-80 Hz) do hipocampo (Buzsáki, 2001;

Hormuzdi et al., 2001) e redução na sincronia nos ritmos na banda gama e teta (5-10 Hz) no neocortex (Deans et al., 2001).

As oscilações no ritmo teta são observadas no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de roedores (Dugué et al., 2009; Hoffmann e Berry, 2009). A oscilação do tipo teta dessincroniza-se rapidamente em resposta à atividade cognitiva e estímulos sensoriais externos, assim como ocorre com o ritmo alfa em humanos (Klimesch, 1999; Dugué et al., 2009). Existem evidências de que a sincronização teta relaciona-se à memória operacional e à memória de longo prazo (Klimesch, 1999; Hoffmann e Berry, 2009).

No hipocampo de ratos, a fase da oscilação no ritmo teta influenciaria o tipo de plasticidade induzida por uma estimulação (Fell e Axmacher, 2011). Depressão de longa duração (LTD) e potenciação de longa duração (LTP) referem-se, respectivamente, à piora ou à melhora na eficiência da atividade sináptica dependente de atividade (Ito, 2006; Schonewille et al. 2011). Quando a estimulação ocorre no pico da onda que representa a oscilação, induz a LTP. Se a estimulação ocorre no vale, induz a depressão de longa duração LTD (Fell e Axmacher, 2011). A aprendizagem associativa envolvendo circuitos cerebelares envolve a interação entre hipocampo e cerebelo por meio de oscilações na banda teta (Hoffmann e Berry, 2009).

Sendo assim, as funções cognitivas do cerebelo poderiam ser mediadas pelo seu envolvimento em oscilações rítmicas envolvendo diferentes regiões encefálicas. Entender como as oscilações são geradas e estão envolvidas com o processamento de informação no SNC pode ser decisivo para a compreensão de processos cognitivos como memória, atenção e percepção visual.

As células de Golgi disparam espontaneamente in vitro. Em condições de repouso in vivo, as células de Golgi acopladas mostram intensa sincronização na ausência de estimulação sináptica e disparam em fase com oscilações locais na frequência teta. A rede de células de Golgi acopladas eletricamente causa inibição rítmica das células granulares, o que desaparece quando o animal inicia algum comportamento (Dugue et al., 2009). Não se conhecem os mecanismos subjacentes à oscilação teta ou se as células de Golgi estão envolvidas com eles. A caracterização molecular dos circuitos neuronais, identificando diferentes proteínas, a sua localização e a relação funcional entre elas seria um passo importante para compreender como ocorrem tais oscilações nas redes neuronais.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, detectamos pela primeira vez a Cx36 e a Cx43 no cerebelo de aves. Além disso, realizamos a primeira análise detalhada da expressão de Cxs no desenvolvimento cerebelar. Assim como foi observado em outras espécies e regiões do SNC, observamos a Cx36 e a Cx43 em neurônios e astrócitos, respectivamente. Durante o desenvolvimento cerebelar, encontramos um aumento na quantidade de Cx36 e Cx43, o qual pode ser atribuído tanto à regulação da expressão gênica como a mecanismos pós-transcripcionais.

No período pós-natal, a Cx43 encontra-se em astrócitos da substância branca, astrócitos da substância cinzenta e na glia de Bergmann. Além do acoplamento entre astrócitos, é possível que a Cx43 esteja presente em JCs conectando astrócitos a neurônios e oligodendrócitos. O início da expressão de Cx43 coincide com o aparecimento das primeiras células precursoras gliais e de sinapses no córtex cerebelar. O aumento da expressão de Cx43 no período embrionário e pós-natal pode ser associado ao número crescente de astrócitos no córtex cerebelar e seu amadurecimento funcional. Além disso, sugere que a comunicação via Cx43 seja importante tanto na sinaptogênese quanto na maturação dos circuitos cerebelares. Pela primeira vez, a Cx43 foi observada em pontos de contato entre os processos da glia de Bergmann e as células granulares em migração.

A Cx36 encontra-se principalmente em dendritos de células da GL, provavelmente células de Golgi, no período pós-natal. O aumento da expressão de Cx36 com o desenvolvimento cerebelar pode ser atribuído à participação dessa Cx na formação de circuitos neuronais. Nossos resultados sugerem ainda que a Cx36 participa de diferentes estágios de diferenciação das células granulares. Ao contrário de estudos realizados em ratos, observamos a presença de Cx36 na EGL, a camada germinativa externa do cerebelo e região de origem das células granulares. A Cx36 foi observada pela primeira vez em torno de células granulares em migração e em processos emitidos por elas. Além disso, não conhecemos estudo algum que tenha mostrado a Cx36 em associação a células em migração no SNC.

Observamos ainda uma grande similaridade na distribuição espacial de Cx36 e de mGluR2/3 nos períodos embrionário e pós-natal. Esse resultado sugere a existência de uma relação funcional entre essas duas proteínas em diferentes momentos do desenvolvimento

cerebelar. A aparente associação entre Cx36 e mGluR2/3 no córtex cerebelar corrobora descobertas de estudos recentes sobre a relação entre proteínas constituintes de JCs e de sinapses químicas.

A modulação da expressão gênica e proteica da Cx43 e da Cx36 no período embrionário e pós-natal, assim como sua associação com eventos específicos durante o desenvolvimento do cerebelo, sugere que essas Cxs sejam parte dos mecanismos que regulam a histogênese e maturação dos circuitos cerebelares. A análise da distribuição da Cx36 e Cx43 no córtex cerebelar indica também que existem similaridades e diferenças no padrão de expressão de Cxs entre diferentes espécies de vertebrados.

REFERÊNCIAS*

- Aberg ND, Rönnbäck L, Eriksson PS. Connexin43 mRNA and protein expression during postnatal development of defined brain regions. *Dev Brain Res.* 1999;115:97-101.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 4th ed. New York: Garland Publishing; 2002.
- Abrams CK, Bennett MVL, Verselis VK, Bargiello TA. Voltage opens unopposed gap junction hemichannels formed by a connexin 32 mutant associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:3980-4.
- Aggarwal S, Yurlova L, Simons M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol.* 2011;21:585-93.
- Agulhon C, Petravic J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, et al. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron.* 2008;59:932-46.
- Allen NJ, Barres BA. Glia - more than just brain glue. *Nature.* 2009;457:675-7.
- Altevogt BM, Kleopa KA, Postma FR, Scherer SS, Paul DL. Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci.* 2002;22:6458-70.
- Altman J, Bayer SA. *Development of the Cerebellar System: In Relation to its Evolution, Structure, and Functions.* Boca Raton: CRC Press; 1997.
- Alvarez-Maubecin V, Garcia-Hernandez F, Williams JT, Van Bockstaele EJ. Functional coupling between neurons and glia. *J Neurosci.* 2000;20:4091-8.
- Amrein I, Isler K, Lipp H-P. Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage. *Eur J Neurosci.* 2011;34:978-87.
- Ango F, Wu C, Van der Want JJ, Wu P, Schachner M, Huang ZJ. Bergmann glia and the recognition molecule CHL1 organize GABAergic axons and direct innervation of Purkinje cell dendrites. *PLoS Biol.* 2008;6:103.
- Araque A. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol.* 2008;4:3-10.
- Arumugam H, Liu X, Colombo PJ, Corriveau RA, Belousov AB. NMDA receptors regulate developmental gap junction uncoupling via CREB signaling. *Nat Neurosci.* 2005;8:1720-6.
- Balsters JH, Cussans E, Diedrichsen J, Phillips KA, Preuss TM, Rilling JK, et al. Evolution of the cerebellar cortex: the selective expansion of prefrontal-projecting cerebellar lobules. *Neuroimage.* 2010;49:2045-52.

Barmack NH, Yakhnitsa V. Functions of interneurons in mouse cerebellum. *J Neurosci*. 2008;28:1140-52.

Barnea A, Pravosudov V. Birds as a model to study adult neurogenesis: bridging evolutionary, comparative and neuroethological approaches. *Eur J Neurosci*. 2011;34:884-907.

Barros CS, Franco SJ, Müller U. Extracellular matrix: functions in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3:a005108.

Bastianelli E. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum*. 2003;2:242-62.

Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*. 2001;81:871-927.

Belgacem YH, Borodinsky LN. Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;108:4482-7.

Belliveau DJ, Kidder GM, Naus CC. Expression of gap junction genes during postnatal neural development. *Dev Genet*. 1991;12:308-17.

Belluardo N, Mudò G, Trovato-Salinaro A, Le Gurun S, Charollais A, Serre-Beinier V, et al. Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain. *Brain Res*. 2000;865:121-38.

Bennett MV. Gap junctions as electrical synapses. *J Neurocytol*. 1997;26:349-66.

Bennett MV. The early history of the synapse: from Plato to Sherrington. *Brain Res Bull*. 1999;50:95-118.

Bennett MV. Electrical synapses, a personal perspective (or history). *Brain Res Rev*. 2000;32:16-28.

Bennett MV, Zukin RS. Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron*. 2004;41:495-511.

Bennett MVL, Contreras JE, Bukauskas FF, Sáez JC. New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci*. 2003;26:610-7.

Benninger RKP, Zhang M, Head WS, Satin LS, Piston DW. Gap junction coupling and calcium waves in the pancreatic islet. *Biophys J*. 2008;95:5048-61.

Bernardinelli Y, Salmon C, Jones EV, Farmer WT, Stellwagen D, Murai KK. Astrocytes display complex and localized calcium responses to single-neuron stimulation in the hippocampus. *J Neurosci*. 2011;31:8905-19.

Bittman KS, LoTurco JJ. Differential regulation of connexin 26 and 43 in murine neocortical precursors. *Cereb Cortex*. 1999;9:188-95.

Bloomfield SA, Völgyi B. The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10:495-506.

Bonfanti L, Peretto P. Adult neurogenesis in mammals: a theme with many variations. *Eur J Neurosci*. 2011;34:930-50.

Brickley SG, Cull-Candy SG, Farrant M. Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABAA receptors. *J Physiol*. 1996;497:753-9.

Bruzzone R, White TW, Goodenough DA. The cellular Internet: on-line with connexins. *Bioessays*. 1996;18:709-18.

Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:13644-9.

Bruzzone R, Dermietzel R. Structure and function of gap junctions in the developing brain. *Cell Tissue Res*. 2006;326:239-48.

Buard I, Steinmetz CC, Claudepierre T, Pfrieger FW. Glial cells promote dendrite formation and the reception of synaptic input in Purkinje cells from postnatal mice. *Glia*. 2010;58:538-45.

Bukauskas FF, Verselis VK. Gap junction channel gating. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1662:42-60.

Buzsáki G. Electrical wiring of the oscillating brain. *Neuron*. 2001;31:342-4.

Cameron SJ, Malik S, Akaike M, Lerner-Marmarosh N, Yan C, Lee J-D, et al. Regulation of epidermal growth factor-induced connexin 43 gap junction communication by big mitogen-activated protein kinase1/ERK5 but not ERK1/2 kinase activation. *J Biol Chem*. 2003;278:18682-8.

Carper RA, Courchesne E. Inverse correlation between frontal lobe and cerebellum sizes in children with autism. *Brain*. 2000;123:836-44.

Carvalho MC, Nazari EM, Farina M, Muller YMR. Behavioral, morphological, and biochemical changes after in ovo exposure to methylmercury in chicks. *Toxicol Sci*. 2008;106:180-5.

Chamberlain SR, Robbins TW, Sahakian BJ. The neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry*. 2007;61:1317-9.

Chang Q, Gonzalez M, Pinter MJ, Balice-Gordon RJ. Gap junctional coupling and patterns of connexin expression among neonatal rat lumbar spinal motor neurons. *J Neurosci.* 1999;19:10813-28.

Cheng YC, Lee CJ, Badge RM, Orme AT, Scotting PJ. Sox8 gene expression identifies immature glial cells in developing cerebellum and cerebellar tumours. *Mol Brain Res.* 2001;92:193-200.

Cicirata F, Nicotra A, Cicero D, Parenti R, Zappalà A. Cloning and expression pattern of connexin39, a new member of the gap junction gene family isolated from the neural tube of chicken embryos. *Gene.* 2004;328:121-6.

Cline HT. Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr. Opin Neurobiol.* 2001;11:118-26.

Condorelli DF, Parenti R, Spinella F, Trovato Salinaro A, Belluardo N, Cardile V, Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci.* 1998;10:1202-8.

Condorelli DF, Belluardo N, Trovato-Salinaro A, Mudò G. Expression of Cx36 in mammalian neurons. *Brain Res Rev.* 2000;32:72-85.

Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, et al. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:15735-40.

Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, et al. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:15735-40.

Cotrina ML, Lin JH, López-García JC, Naus CC, Nedergaard M. ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci.* 2000;20:2835-44.

Courtemanche R, Chabaud P, Lamarre Y. Synchronization in primate cerebellar granule cell layer local field potentials: basic anisotropy and dynamic changes during active expectancy. *Front Cell Neurosci.* 2009;3:6.

Courtemanche R, Lamarre Y. Local field potential oscillations in primate cerebellar cortex: synchronization with Cerebral Cortex during active and passive expectancy. *J Neurophys.* 2005;93:2039-52.

Cushing P, Bhalla R, Johnson AM, Rushlow WJ, Meakin SO, Belliveau DJ. Nerve growth factor increases connexin43 phosphorylation and gap junctional intercellular communication. *J Neurosci Res.* 2005;82:788-801.

De Bellis MD, Kuchibhatla M. Cerebellar volumes in pediatric maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry.* 2006;60:697-703.

de la Rosa EJ, de Pablo F. Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci.* 2000;23:454-8.

Deans MR, Gibson JR, Sellitto C, Connors BW, Paul DL. Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36. *Neuron.* 2001;31:477-85.

Dehay C, Kennedy H. Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci.* 2000;1:438-50.

Dermietzel R, Hertberg EL, Kessler JA, Spray DC. Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *J Neurosci.* 1991;11:1421-32.

Dermietzel R, Traub O, Hwang TK, Beyer E, Bennett MV, Spray DC, et al. Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:10148-52.

Desmond JE, Gabrieli JD, Wagner AD, Ginier BL, Glover GH. Lobular patterns of cerebellar activation in verbal working-memory and finger-tapping tasks as revealed by functional MRI. *J Neurosci.* 1997;17:9675-85.

DiCicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, Courchesne E, Dager SR, Schmitz C, et al. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *J Neurosci.* 2006;26:6897-906.

Dizon MJ, Khodakhah K. The role of interneurons in shaping Purkinje cell responses in the cerebellar cortex. *J Neurosci.* 2011;31:10463-73.

Dugué GP, Brunel N, Hakim V, Schwartz E, Chat M, Lévesque M, et al. Electrical coupling mediates tunable low-frequency oscillations and resonance in the cerebellar Golgi cell network. *Neuron.* 2009;61:126-39.

Duval N, Gomès D, Calaora V, Calabrese A, Meda P, Bruzzone R. Cell coupling and Cx43 expression in embryonic mouse neural progenitor cells. *J Cell Sci.* 2002;115:3241-51.

Eiberger J, Kibschull M, Strenzke N, Schober A, Büssow H, Wessig C, et al. Expression pattern and functional characterization of connexin29 in transgenic mice. *Glia.* 2006;53:601-11.

Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, et al. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol.* 1995;129:805-17.

Elias LAB, Kriegstein AR. Gap junctions: multifaceted regulators of embryonic cortical development. *Trends Neurosci.* 2008;31:243-50.

Elias LAB, Wang DD, Kriegstein AR. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature*. 2007;448:901-7.

Elias LAB, Turmaine M, Parnavelas JG, Kriegstein AR. Connexin 43 mediates the tangential to radial migratory switch in ventrally derived cortical interneurons. *J Neurosci* . 2010;30:7072-7.

Emoto K. Dendrite remodeling in development and disease. *Dev Growth Differ*. 2011;53:277-86.

Farkas LM, Huttner WB. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20:707-15.

Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Lee S. Phosphodiesterase-4A expression is reduced in cerebella of patients with bipolar disorder. *Psychiatr Genet*. 2008;18:282-8.

Feig SL, Haberly LB. Surface-associated astrocytes, not endfeet, form the glia limitans in posterior piriform cortex and have a spatially distributed, not a domain, organization. *J Comp Neurol*. 2011;519:1952-69.

Feirabend HK. Development of longitudinal patterns in the cerebellum of the chicken (*Gallus domesticus*):a cytoarchitectural study on the genesis of cerebellar modules. *Eur J Morphol*. 1990;28:169-223.

Fell J, Axmacher N. The role of phase synchronization in memory processes. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12:105-18.

Fellin T, Halassa MM, Terunuma M, Succol F, Takano H, Frank M, et al. Endogenous nonneuronal modulators of synaptic transmission control cortical slow oscillations in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:15037-42.

Freeman JH, Steinmetz AB. Neural circuitry and plasticity mechanisms underlying delay eyeblink conditioning. *Cold Spring Harbor*. 2011;18:666-77.

Fróes MM, Correia AH, Garcia-Abreu J, Spray DC, Campos de Carvalho AC, Neto MV. Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:7541-6.

Fushiki D, Hamada Y, Yoshimura R, Endo Y. Phylogenetic and bioinformatic analysis of gap junction-related proteins, innexins, pannexins and connexins. *Biomed Res*. 2010;31:133-42.

Fushiki S, Perez Velazquez JL, Zhang L, Bechberger JF, Carlen PL, Naus CCG. Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62:304-14.

Fuster JM. Executive frontal functions. *Exp Brain Res*. 2000;133:66-70.

Galarreta M, Hestrin S. A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature*. 1999;402:72-5.

Galarreta M, Hestrin S. Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2:425-33.

Galliano E, Mazzarello P, D'Angelo E. Discovery and rediscoveries of Golgi cells. *J Physiol*. 2010;588:3639-55.

Gao JH, Parsons LM, Bower JM, Xiong J, Li J, Fox PT. Cerebellum implicated in sensory acquisition and discrimination rather than motor control. *Science*. 1996;272:545-7.

Geurts FJ, De Schutter E, Dieudonné S. Unraveling the cerebellar cortex:cytology and cellular physiology of large-sized interneurons in the granular layer. *Cerebellum*. 2003;2:290-9.

Giaume C, Fromaget C, el Aoumari A, Cordier J, Glowinski J, Gros D. Gap junctions in cultured astrocytes:single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron*. 1991;6:133-43.

Gibson DA, Ma L. Developmental regulation of axon branching in the vertebrate nervous system. *Development*. 2011;138:183-95.

Goldowitz D, Hamre K. The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci*. 1998;21:375-82.

González-Nieto D, Gómez-Hernández JM, Larrosa B, Gutiérrez C, Muñoz MD, Fasciani I, et al. Regulation of neuronal connexin-36 channels by pH. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:17169-74.

Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap:functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:285-94.

Goodenough DA, Paul DL. Gap junctions. *Cold Spring Harbor*. 2009;1:a002576.

Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:777-88.

Gouwens NW, Zeberg H, Tsumoto K, Tateno T, Aihara K, Robinson HPC. Synchronization of firing in cortical fast-spiking interneurons at gamma frequencies:a phase-resetting analysis. *PloS Comput Biol*. 2010;6:1-13.

Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A. Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *Journal Neurosci Res*. 2002;68:138-49.

Grosche J, Matyash V, Möller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H. Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci.* 1999;2:139-43.

Guedes, VA. Ontogênese de conexinas no cerebelo. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

Gulisano M, Parenti R, Spinella F, Cicirata F. Cx36 is dynamically expressed during early development of mouse brain and nervous system. *Neuroreport.* 2000;11:3823-8.

Gündel H, O'Connor M-F, Littrell L, Fort C, Lane RD. Functional neuroanatomy of grief: an FMRI study. *American J Psych.* 2003;160:1946-53.

Habas C. Functional imaging of the deep cerebellar nuclei: a review. *Cerebellum.* 2010;9:22-8.

Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med.* 2007;13:54-63.

Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong J-H, Haydon PG. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci.* 2007;27:6473-7.

Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee S-Y, Abel T, et al. Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron.* 2009;61:213-9.

Hamzei-Sichani F, Davidson KGV, Yasumura T, Janssen WGM, Wearne SL, Hof PR, et al. Mixed Electrical-Chemical Synapses in Adult Rat Hippocampus are Primarily Glutamatergic and Coupled by Connexin-36. *Front Neuroanat.* 2012; 6:13.

Henneberger C, Papouin T, Oliet SHR, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature.* 2010;463:232-6.

Hartfield EM, Rinaldi F, Glover CP, Wong L-F, Caldwell MA, Uney JB. Connexin 36 expression regulates neuronal differentiation from neural progenitor cells. *PloS One.* 2011;6:e14746.

Heine SA, Highstein SM, Blazquez PM. Golgi cells operate as state-specific temporal filters at the input stage of the cerebellar cortex. *J Neurosci.* 2010;30:17004-14.

Hestrin S. Neuroscience. The strength of electrical synapses. *Science.* 2011;334:315-6.

Hettiarachchi NT, Dallas ML, Pearson HA, Bruce G, Deuchars S, Boyle JP, et al. Gap junction-mediated spontaneous Ca(2+) waves in differentiated cholinergic SN56 cells. *Bioch. Biophys Res Comm.* 2010;397:564-8.

Hoge GJ, Davidson KGV, Yasumura T, Castillo PE, Rash JE, Pereda AE. The extent and strength of electrical coupling between inferior olivary neurons is heterogeneous. *Journal Neurophys.* 2011;105:1089-101.

Holtzman T, Rajapaksa T, Mostofi A, Edgley SA. Different responses of rat cerebellar Purkinje cells and Golgi cells evoked by widespread convergent sensory inputs. *J Physiol.* 2006;574:491-507.

Hoogland TM, Kuhn B, Göbel W, Huang W, Nakai J, Helmchen F, et al. Radially expanding transglial calcium waves in the intact cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:3496-501.

Hoogland TM, Kuhn B. Recent developments in the understanding of astrocyte function in the cerebellum in vivo. *Cerebellum.* 2010;9:264-71.

Hoppenbrouwers SS, Schutter DJLG, Fitzgerald PB, Chen R, Daskalakis ZJ. The role of the cerebellum in the pathophysiology and treatment of neuropsychiatric disorders: a review. *Brain Res Rev.* 2008;59:185-200.

Hormuzdi SG, Pais I, LeBeau FE, Towers SK, Rozov A, Buhl EH, et al. Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. *Neuron.* 2001;31:487-95.

Hormuzdi SG, Filippov MA, Mitropoulou G, Monyer H, Bruzzone R. Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1662:113-37.

Hughes SW, Cope DW, Blethyn KL, Crunelli V. Cellular mechanisms of the slow (<1 Hz) oscillation in thalamocortical neurons in vitro. *Neuron.* 2002;33:947-58.

Iino M, Goto K, Kakegawa W, Okado H, Sudo M, Ishiuchi S, et al. Glia-synapse interaction through Ca²⁺-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science.* 2001;292:926-9.

Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochemical pharmacology.* 2001;62:401-5.

Ito M. Mechanisms of motor learning in the cerebellum. *Brain Res.* 2000;886:237-45.

Ito M. Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Progr Neurobiol.* 2006;78:272-303.

Jensen O, Bonnefond M, Vanrullen R. An oscillatory mechanism for prioritizing salient unattended stimuli. *Trends Cogn Sci.* 2012;16:200-6.

Jiang S, Yuan H, Duan L, Cao R, Gao B, Xiong Y-F, et al. Glutamate release through connexin 43 by cultured astrocytes in a stimulated hypertonicity model. *Brain Res.* 2011;1392:8-15.

Kalil K, Szebenyi G, Dent EW. Common mechanisms underlying growth cone guidance and axon branching. *J Neurobiol.* 2000;44:145-58.

Kamasawa N, Sik A, Morita M, Yasumura T, Davidson KGV, Nagy JI, et al. Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and

Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning. *Neuroscience.* 2005;136:65-86.

Kandel ER, Schwartz JH, Thomas MJ. *Principles of Neuroscience.* 4th ed. New York: McGraw-Hill;2000.

Kandler K, Katz LC. Coordination of neuronal activity in developing visual cortex by gap junction-mediated biochemical communication. *J Neurosci.* 1998;18:1419-27.

Katz LC, Shatz CJ. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science.* 1996;274:1133-8.

Katz LC, Shatz CJ. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science.* 1996;274:1133-8.

Katz LC. Coordinate activity in retinal and cortical development. *Curr Opin Neurobiol.* 1993;3:93-9.

Kenyon GT. A model of long-term memory storage in the cerebellar cortex: a possible role for plasticity at parallel fiber synapses onto stellate/basket interneurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:14200-5.

Kihara AH, Mantovani de Castro L, Belmonte MA, Yan CYI, Moriscot AS, Hamassaki DE. Expression of connexins 36, 43, and 45 during postnatal development of the mouse retina. *J Neurobiol.* 2006;66:1397-410.

Kihara AH, Paschon V, Akamine PS, Saito KC, Leonelli M, Jiang JX, et al. Differential expression of connexins during histogenesis of the chick retina. *Dev Neurobiol.* 2008;68:1287-302.

Kihara AH, Paschon V, Cardoso CM, Higa GSV, Castro LM, Hamassaki DE, et al. Connexin36, an essential element in the rod pathway, is highly expressed in the essentially rodless retina of *Gallus gallus*. *J Comp Neurol.* 2009;512:651-63.

Nave K-A. Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11:275-83.

Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Rev.* 1999;29:169-95.

- Koeppen AH. The pathogenesis of spinocerebellar ataxia. *Cerebellum*. 2005;4:62-73.
- Koirala S, Corfas G. Identification of Novel Glial Genes by Single-Cell Transcriptional Profiling of Bergmann Glial Cells from Mouse Cerebellum. *PloS One*. 2010;5:e9198.
- Komuro H, Kumada T. Ca^{2+} transients control CNS neuronal migration. *Cell Calcium*. 2005;37:387-93.
- Komuro H, Rakic P. Dynamics of granule cell migration:a confocal microscopic study in acute cerebellar slice preparations. *J Neurosci*. 1995;15:1110-20.
- Komuro H, Yacubova E, Rakic P. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci* . 2001;21:527-40.
- Koós T, Tepper JM. Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci*.1999;2:467-72.
- Kordes U, Cheng Y-C, Scotting PJ. Sox group E gene expression distinguishes different types and maturational stages of glial cells in developing chick and mouse. *Dev Brain Res*. 2005;157:209-13.
- Köster-Patzlaff C, Hosseini SM, Reuss B. Layer specific changes of astroglial gap junctions in the rat cerebellar cortex by persistent Borna Disease Virus infection. *Brain Res*. 2008;1219:143-58.
- Köster-Patzlaff C, Hosseini SM, Reuss B. Loss of connexin36 in rat hippocampus and cerebellar cortex in persistent Borna disease virus infection. *J Chem Neuroanat*. 2009;37:118-27.
- Kothmann WW, Massey SC, O'Brien J. Dopamine-stimulated dephosphorylation of connexin 36 mediates AII amacrine cell uncoupling. *J Neurosci*. 2009;29:14903-11.
- Kriegstein AR, Götz M. Radial glia diversity:a matter of cell fate. *Glia*. 2003;43:37-43.
- Kriegstein AR, Noctor SC. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci*. 2004;27:392-9.
- Laird DW, Puranam KL, Revel JP. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J*. 273:67-72.
- Lampe PD, Lau AF. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys*. 2000;384:205-15.
- Landisman CE, Long MA, Beierlein M, Deans MR, Paul DL, Connors BW. Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *J Neurosci* . 2002;22:1002-9.

Larouche M, Hawkes R. From clusters to stripes: the developmental origins of adult cerebellar compartmentation. *Cerebellum*. 2006;5:77-88.

Le AC, Musil LS. A novel role for FGF and extracellular signal-regulated kinase in gap junction-mediated intercellular communication in the lens. *J Cell Biol*. 2001;154:197-216.

Leybaert L, Paemeleire K, Strahonja A, Sanderson MJ. Inositol-trisphosphate-dependent intercellular calcium signaling in and between astrocytes and endothelial cells. *Glia*. 1998;24:398-407.

Li C, Zhao R, Gao K, Wei Z, Yin MY, Lau LT, et al. Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Cur Alzheimer Res*. 2011;8:67-80.

Li WE, Ochalski PA, Hertzberg EL, Nagy JI. Immunorecognition, ultrastructure and phosphorylation status of astrocytic gap junctions and connexin43 in rat brain after cerebral focal ischaemia. *Eur J Neurosci*. 1998;10:2444-63.

Lin JC, Cepko CL. Granule cell raphes and parasagittal domains of Purkinje cells: complementary patterns in the developing chick cerebellum. *J Neurosci*. 1998;18:9342-9353.

Lordkipanidze T, Dunaevsky A. Purkinje cell dendrites grow in alignment with Bergmann glia. *Glia*. 2005;51:229-34.

Luckner R, Obst-Pernberg K, Hirano S, Suzuki ST, Redies C. Granule cell raphes in the developing mouse cerebellum. *Cell Tissue Res*. 2001;303:159-72.

Magnotti LM, Goodenough DA, Paul DL. Deletion of oligodendrocyte Cx32 and astrocyte Cx43 causes white matter vacuolation, astrocyte loss and early mortality. *Glia*. 2011a;59:1064-74.

Magnotti LM, Goodenough DA, Paul DL. Functional heterotypic interactions between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *Glia*. 2011b;59:26-34.

Malatesta P, Appolloni I, Calzolari F. Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res*. 2008;331:165-78.

Mann-Metzer P, Yarom Y. Electrotonic coupling interacts with intrinsic properties to generate synchronized activity in cerebellar networks of inhibitory interneurons. *J Neurosci*. 1999;19:3298-306.

Margeta MA, Shen K. Molecular mechanisms of synaptic specificity. *Molecular and cellular neurosciences*. 2010;43:261-7.

Marín O, Rubenstein JLR. Cell migration in the forebrain. *Ann Rev Neurosci*. 2003;26:441-83.

Martins RAP, Silveira MS, Curado MR, Police AI, Linden R. NMDA receptor activation modulates programmed cell death during early post-natal retinal development: a BDNF-dependent mechanism. *J Neurochem.* 2005;95:244-53.

Marzban H, Chung S-H, Pezhouh MK, Feirabend H, Watanabe M, Voogd J, et al. Antigenic compartmentation of the cerebellar cortex in the chicken (*Gallus domesticus*). *J Comp Neurol.* 2010;518:2221-39.

Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Annals Acad Sci.* 2008; 1144:97-112.

Maxeiner S, Krüger O, Schilling K, Traub O, Urschel S, Willecke K. Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience.* 2003;119:689-700.

Mecha M, Peña-melián AL, Blanco MJ. Microarchitectural changes during development of the cerebellar cortex. *Int. J. Dev. Biol.* 2010;698:691-8.

Medhurst AD, Harrison DC, Read SJ, Campbell CA, Robbins MJ, Pangalos MN. The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J Neurosci Method.* 2000;98:9-20.

Meier C, Petrasch-Parwez E, Habbes H-W, Teubner B, Güldenagel M, Degen J, et al. Immunohistochemical detection of the neuronal connexin36 in the mouse central nervous system in comparison to connexin36-deficient tissues. *Histochem Cell Biol.* 2002;117:461-71.

Melom JE, Littleton JT. Synapse development in health and disease. *Curr Opin Gen Dev.* 2011;21:256-61.

Menichella DM, Goodenough DA, Sirkowski E, Scherer SS, Paul DL. Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *J Neurosci.* 2003;23:5963-73.

Mercier F, Hatton GI. Connexin 26 and basic fibroblast growth factor are expressed primarily in the subpial and subependymal layers in adult brain parenchyma: roles in stem cell proliferation and morphological plasticity? *J Comp Neurol.* 2001;431:88-104.

Meşe G, Richard G, White TW. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 2007;127:2516-24.

Metea MR, Newman EA. Calcium signaling in specialized glial cells. *Glia.* 2006;54:650-5.

Michel CM, Murray MM. Towards the utilization of EEG as a brain imaging tool. *Neuroimage.* 2011;61:371-85.

Milosevic A, Goldman JE. Potential of progenitors from postnatal cerebellar neuroepithelium and white matter: lineage specified vs. multipotent fate. *Mol Cel Neurosci.* 2004;26:342-53.

- Miragall F, Albiez P, Bartels H, de Vries U, Dermietzel R. Expression of the gap junction protein connexin43 in the subependymal layer and the rostral migratory stream of the mouse:evidence for an inverse correlation between intensity of connexin43 expression and cell proliferation activity. *Cell Tissue Res.* 1997;287:243-53.
- Montoro RJ, Yuste R. Gap junctions in developing neocortex:a review. *Brain Res Rev.* 2004;47:216-26.
- Nadarajah B, Makarenkova H, Becker DL, Evans WH, Parnavelas JG. Basic FGF increases communication between cells of the developing neocortex. *J Neurosci.* 1998;18:7881-90.
- Nadarajah B, Parnavelas JG. Gap junction-mediated communication in the developing and adult Cereb Cortex. *Novartis Found Symp.* 1999;219:157-70.
- Nadarajah B, Parnavelas JG. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:423-32.
- Nadarajah B, Thomaidou D, Evans WH, Parnavelas JG. Gap junctions in the adult Cereb Cortex:regional differences in their distribution and cellular expression of connexins. *J Comp Neurol.* 1996;376:326-42.
- Nagy JI, Dudek FE, Rash JE. Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Rev.* 2004;47:191-215.
- Nagy JI, Ionescu A-V, Lynn BD, Rash JE. Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications from normal and connexin32 knockout mice. *Glia.* 2003;44:205-18.
- Nagy JI, Rash JE. Astrocyte and oligodendrocyte connexins of the glial syncytium in relation to astrocyte anatomical domains and spatial buffering. *Cell Comm Adhes.* 2000;10:401-6.
- Nave K-A. Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11:275-83.
- Nedergaard M. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science.* 1994;263:1768-71.
- Nestler EJ, Carlezon WA. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol. Psychiatry.* 2006;59:1151-9.
- Nicotra A, Cicirata F, Martinez S. Analysis of cCx39 expression pattern during chick development. *Dev Brain Res.* 2004;148:179-83.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeño V, Kriegstein AR. Neural stem and progenitor cells in cortical development. *Novartis Found Sympos.* 2007;288:59-73.

Nusser Z, Roberts JD, Baude A, Richards JG, Somogyi P. Relative densities of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors on cerebellar granule cells as determined by a quantitative immunogold method. *J Neurosci*. 1995;15:2948-60.

O'Brien J, al-Ubaidi MR, Ripps H. Connexin 35: a gap-junctional protein expressed preferentially in the skate retina. *Mol Biol Cell*. 1996;7:233-43.

O'Brien J, Bruzzone R, White TW, Al-Ubaidi MR, Ripps H. Cloning and expression of two related connexins from the perch retina define a distinct subgroup of the connexin family. *J Neurosci*. 1998;18:7625-37.

Ohishi H, Ogawa-Meguro R, Shigemoto R, Kaneko T, Nakanishi S, Mizuno N. Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, in rat cerebellar cortex. *Neuron*. 1994;13:55-66.

Okada H, Miyakawa N, Mori H, Mishina M, Miyamoto Y, Hisatsune T. NMDA receptors in cortical development are essential for the generation of coordinated increases in $[Ca^{2+}]_i$ in "neuronal domains". *Cereb Cortex*. 2003;13:749-57.

Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MVL, Naus CC, et al. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J Neurochem*. 2011;118:826-40.

Orthmann-Murphy JL, Abrams CK, Scherer SS. Gap junctions couple astrocytes and oligodendrocytes. *J Mol Neurosci*. 2008;35:101-16.

Otis T. Helping thy neighbors: spillover at the mossy fiber glomerulus. *Neuron*. 2002;35:412-4.
Oyamada M, Takebe K, Oyamada Y. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochem Biophys Acta*. No prelo 2012.

Paixão S, Klein R. Neuron-astrocyte communication and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 2010;20:466-73.

Pakhotin P, Verkhratsky A. Electrical synapses between Bergmann glial cells and Purkinje neurones in rat cerebellar slices. *Mol Cell Neurosci*. 2005;28:79-84.

Panchin YV. Evolution of gap junction proteins: the pannexin alternative. *J Exp Biol*. 2005;208:1415-9.

Pangratz-Fuehrer S, Hestrin S. Synaptogenesis of electrical and GABAergic synapses of fast-spiking inhibitory neurons in the neocortex. *J Neurosci*. 2011;31:10767-75.

Park W-M, Wang Y, Park S, Denisova JV, Fontes JD, Belousov AB. Interplay of chemical neurotransmitters regulates developmental increase in electrical synapses. *J Neurosci*. 2011;31:5909-20.

Parnavelas JG, Alifragis P, Nadarajah B. The origin and migration of cortical neurons. *Progress in Brain Res.* 2002;136:73-80.

Parys B, Côté A, Gallo V, De Koninck P, Sîk A. Intercellular calcium signaling between astrocytes and oligodendrocytes via gap junctions in culture. *Neuroscience.* 2010;167:1032-43.

Peinado A, Yuste R, Katz LC. Gap junctional communication and the development of local circuits in neocortex. *Cereb Cortex.* 1991;3:488-98.

Perea G, Araque A. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell calcium.* 2005;38:375-82.

Perea G, Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science.* 2007 Aug;317:1083-6.

Perea G, Araque A. GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev.* 2010;63:93-102.

Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses:astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 2009;32:421-31.

Person AL, Raman IM. Purkinje neuron synchrony elicits time-locked spiking in the cerebellar nuclei. *Nature.* 2012;481:502-5.

Piet R, Jahr CE. Glutamatergic and purinergic receptor-mediated calcium transients in Bergmann glial cells. *J Neurosci.* 2007;27:4027-35.

Pijpers A, Apps R, Pardoe J, Voogd J, Ruigrok TJH. Precise spatial relationships between mossy fibers and climbing fibers in rat cerebellar cortical zones. *J Neurosci.* 2006;26:12067-80.

Pompolo S, Harley VR. Localisation of the SRY-related HMG box protein, SOX9, in rodent brain. *Brain Res.* 2001;906:143-8.

Pope PA, Miall RC. Task-specific facilitation of cognition by cathodal transcranial direct current stimulation of the cerebellum. *Brain stimulation.* 2012;5:84-94.

Popratiloff A, Pollack SM, Giaume C, Peusner KD. Differential expression of connexin 43 in the chick tangential vestibular nucleus. *J Neurosci Res.* 2003;71:617-28.

Rakic P. A century of progress in corticoneurogenesis:from silver impregnation to genetic engineering. *Cereb Cortex.* 2006;16:3-17.

Rakic P. Evolution of the neocortex:a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10:724-35.

Rakic P. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res.* 1971;33:471-6.

- Rakic P. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol.* 1971;141:283-312.
- Rakic P. The radial edifice of cortical architecture:from neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain Res Rev.* 2007;55:204-19.
- Ramnani N. The primate cortico-cerebellar system:anatomy and function. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7:511-22.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science.* 2008; 322:1551–55.
- Rozental R, Giaume C, Spray DC. Gap junctions in the nervous system. *Brain Res Rev.* 2000;32:11-5.
- Rozental R, Srinivas M, Gökhan S, Urban M, Dermietzel R, Kessler JA, et al. Temporal expression of neuronal connexins during hippocampal ontogeny. *Brain Res Rev.* 2000 ;32:57-71.
- Ryding E, Decety J, Sjöholm H, Stenberg G, Ingvar DH. Motor imagery activates the cerebellum regionally. *Cogn Brain Res.* 1993;1:94-9.
- Salameh A. Life cycle of connexins:regulation of connexin synthesis and degradation. *Ad Cardiol.* 2006;42:57-70.
- Sandyk R, Kay SR, Merriam AE. Atrophy of the cerebellar vermis:relevance to the symptoms of schizophrenia. *J Neurosci.* 1991;57:205-12.
- Santiago MF, Alcamí P, Striedinger KM, Spray DC, Scemes E. The carboxyl-terminal domain of connexin43 is a negative modulator of neuronal differentiation. *J Biol Chem.* 2010;285:11836-45.
- Scemes E, Dermietzel R, Spray DC. Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice. *Glia.* 1998;24:65-73.
- Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain.* 1998;121:561-79.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols.* 2008;3:1101-8.
- Schonewille M, Gao Z, Boele H-J, Veloz MFV, Amerika WE, Simek AAM, et al. Reevaluating the role of LTD in cerebellar motor learning. *Neuron.* 2011;70:43-50.
- Schoppa NE, Westbrook GL. AMPA autoreceptors drive correlated spiking in olfactory bulb glomeruli. *Nat Neurosci.* 2002;5:1194-202.

Segretain D, Falk MM. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1662:3-21.

Sepúlveda MR, Hidalgo-Sánchez M, Mata AM. A developmental profile of the levels of calcium pumps in chick cerebellum. *J Neurochem*. 2005;95:673-83.

Shatz CJ. Impulse activity and the patterning of connections during CNS development. *Neuron*. 1990;5:745-56.

Solan JL, Lampe PD. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J*. 2009;419:261-72.

Song J-H, Wang Y, Fontes JD, Belousov AB. Regulation of connexin 36 expression during development. *Neurosci Lett*. 2012;513:17-9.

Sonntag S, Söhl G, Dobrowolski R, Zhang J, Theis M, Winterhager E, et al. Mouse lens connexin23 (Gje1) does not form functional gap junction channels but causes enhanced ATP release from HeLa cells. *Eur J Cell Biol*. 2009;88:65-77.

Sotelo C, Llinás R. Specialized membrane junctions between neurons in the vertebrate cerebellar cortex. *J Cell Biol*. 1972;53:271-89.

Spitzer NC. Electrical activity in early neuronal development. *Nature*. 2006;444:707-12.

Spray DC, Ye Z-C, Ransom BR. Functional connexin “hemichannels”: a critical appraisal. *Glia*. 2006;54:758-73.

Steinmetz CC, Buard I, Claudepierre T, Nägler K, Pfrieder FW. Regional variations in the glial influence on synapse development in the mouse CNS. *J Physiol*. 2006;577:249-61.

Stern CD. The chick embryo: a great model system becomes even greater. *Dev Cell*. 2005;8:9-17.

Stolt CC, Lommes P, Sock E, Chaboissier M-C, Schedl A, Wegner M. The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev*. 2003;17:1677-89.

Stoodley CJ, Schmahmann JD. Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. *Cortex*. 2010;46:831-44.

Strohschein S, Hüttmann K, Gabriel S, Binder DK, Heinemann U, Steinhäuser C. Impact of aquaporin-4 channels on K⁺ buffering and gap junction coupling in the hippocampus. *Glia*. 2011;59:973-80.

Sutor B, Hagerty T. Involvement of gap junctions in the development of the neocortex. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1719:59-68.

Tanaka M, Yamaguchi K, Tatsukawa T, Theis M, Willecke K, Itohara S. Connexin43 and Bergmann glial gap junctions in cerebellar function. *Front Neurosci.* 2008;2:225-33.

Tanaka M. Dendrite formation of cerebellar Purkinje cells. *Neurochem Res.* 2009;34:2078-88.

Teubner B, Odermatt B, Guldenagel M, Sohl G, Degen J, Bukauskas F, et al. Functional expression of the new gap junction gene connexin47 transcribed in mouse brain and spinal cord neurons. *J Neurosci.* 2001;21:1117-26.

Thompson RJ, Macvicar BA. Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels*;2:81-6.

Tian N. Visual experience and maturation of retinal synaptic pathways. *Vision research.* 2004;44:3307-16.

Trosko JE. The gap junction as a “Biological Rosetta Stone”: implications of evolution, stem cells to homeostatic regulation of health and disease in the Barker hypothesis. *Journal of cell communication and signaling.* 2011;5:53-66.

Uhlhaas PJ, Singer W. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11:100-13.

Unwin PN, Zampighi G. Structure of the junction between communicating cells. *Nature.* 1980;283:545-9.

Van Der Giessen RS, Maxeiner S, French PJ, Willecke K, De Zeeuw CI. Spatiotemporal distribution of Connexin45 in the olivocerebellar system. *J Comp Neurol.* 2006;495:173-84.

Varambally S, Venkatasubramanian G, Thirthalli J, Janakiramaiah N, Gangadhar BN. Cerebellar and other neurological soft signs in antipsychotic-naïve schizophrenia. *Acta Psych Scand.* 2006;114:352-6.

Vanrullen R, Macdonald JSP. Perceptual Echoes at 10 Hz in the Human Brain. *Curr Biol.* No prelo 2012.

Venance L, Rozov A, Blatow M, Burnashev N, Feldmeyer D, Monyer H. Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:10260-5.

Vervaeke K, Lorincz A, Gleeson P, Farinella M, Nusser Z, Silver RA. Rapid desynchronization of an electrically coupled interneuron network with sparse excitatory synaptic input. *Neuron.* 2010;67:435-51.

von Maltzahn J, Euwens C, Willecke K, Söhl G. The novel mouse connexin39 gene is expressed in developing striated muscle fibers. *J Cell Sci.* 2004;117:5381-92.

Vos BP, Volny-Luraghi A, De Schutter E. Cerebellar Golgi cells in the rat:receptive fields and timing of responses to facial stimulation. *Eur J Neurosci.* 1999;11:2621-34.

Watanabe D, Nakanishi S. mGluR2 postsynaptically senses granule cell inputs at Golgi cell synapses. *Neuron.* 2003;35:821-9.

Weisheit G, Gliem M, Endl E, Pfeffer PL, Busslinger M, Schilling K. Postnatal development of the murine cerebellar cortex:formation and early dispersal of basket, stellate and Golgi neurons. *Eur J Neurosci.* 2006;24:466-78.

Weissman TA, Riquelme PA, Ivic L, Flint AC, Kriegstein AR. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron.* 2004;43:647-61.

Welsh JP, Llinás R. Some organizing principles for the control of movement based on olivocerebellar physiology. *Progr Brain Res.* 1997 Jan;114:449-61.

Wenzel J, Lammert G, Meyer U, Krug M. The influence of long-term potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain. *Brain Res.* 1991;560:122-31.

White TW, Bruzzone R, Wolfram S, Paul DL, Goodenough DA. Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens:the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J Cell Biol.*1994;125:879-92.

Wiencken-Barger AE, Djukic B, Casper KB, McCarthy KD. A role for Connexin43 during neurodevelopment. *Glia.* 2007;55:675-86.

Wiencken-Barger AE, Djukic B, Casper KB, McCarthy KD. A role for Connexin43 during neurodevelopment. *Glia.* 2007;55:675-86.

Wirenfeldt M, Babcock AA, Vinters HV. Microglia - insights into immune system structure, function, and reactivity in the central nervous system. *Histol Histopathol.* 2011;26:519-30.

Wonders CP, Anderson SA. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7:687-96.

Xin D, Bloomfield SA. Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. *J Comp Neurol.* 1999;405:75-87.

Yacubova E, Komuro H. Cellular and molecular mechanisms of cerebellar granule cell migration. *Cell Biochem Biophys.* 2003;37:213-34.

Yamada K, Watanabe M. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anato Sci Int.* 2002;77:94-108.

Yamamoto T, Vukelic J, Hertzberg EL, Nagy JI. Differential anatomical and cellular patterns of connexin43 expression during postnatal development of rat brain. *Dev Brain Res*. 1992;66:165-80.

Yamazaki T, Tanaka S. Computational models of timing mechanisms in the cerebellar granular layer. *Cerebellum*. 2009;8:423-32.

Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci* . 2003;23:3588-96.

Yuste R, Peinado A, Katz LC. Neuronal domains in developing neocortex. *Science*. 1992;257:665-9.

Zafra F, Lindholm D, Castrén E, Hartikka J, Thoenen H. Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. *J Neurosci* . 1992;12:4793-9.

Zappalà A, Parenti R, La Delia F, Cicirata V, Cicirata F. Expression of connexin57 in mouse development and in harmaline-tremor model. *Neuroscience*. 2010;171:1-11.

Zhang J-ming, Wang H-kun, Ye C-quan, Ge W, Chen Y, Jiang Z-lin, et al. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron*. 2003;40:971-82.

Zhang T. Neural oscillations and information flow associated with synaptic plasticity. *Acta Physiol*. 2011;63:412-22.