GUILHERME SHIGUETO VILAR HIGA

Caracterização de conexinas neuronais no desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos

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 2017 **Guilherme Shigueto Vilar Higa**

Caracterização de conexinas neuronais no desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos

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. Alexandre Hiroaki Kihara

Versão original.

São Paulo 2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Higa, Guilherme Shigueto Vilar Caracterização de conexinas neuronais no desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos / Guilherme Shigueto Vilar Higa; orientador Alexandre Hiroaki Kihara. -- São Paulo, 2017. 131 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Junções comunicantes. 2. Desenvolvimento do hipocampo. 3. Sinapses elétricas. 4. Conexinas . I. Kihara, Alexandre Hiroaki, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Guilherme Shigueto Vilar Higa

Título da Tese: Caracterização de conexinas neuronais no desenvolvimento pósnatal do hipocampo de ratos.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Hiroaki Kihara.

	() Aprovado(a)	() Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:	
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:	



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 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **051** nas fls. **06** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) Alexandre Hiroaki Kihara, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Identificação* e *caracterização morfofuncional das conexinas na ontogênese do hipocampo"* do qual participam o(s) aluno(s)**Guilherme Shigueto Villar Higa, Erika Reime Kinjo,** 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 **21.05.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 22 de maio de 2013.

Fernando k.m. andulkade Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA

Coordenador-CEUA - ICB/USP

rofa. Dra. Ana Paula Lepique Secretária- CEUA - ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.046.2017

12

São Paulo, 19 de maio de 2017.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "*Identificação e caracterização morfofuncional das conexinas na ontogênese do hipocampo*", registrado sob o protocolo nº *51/2013* e aprovado em 21/05/2013, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 21/05/2021**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Rattus norvegicus	Long-Evans	Macho		1º: 40

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Auns

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador - CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Alexandre Hiroaki Kihara** Departamento de **Fisiologia e Biofísica** Instituto de Ciências Biomédicas - USP



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO Fundação Universidade Federal do ABC Comissão de Ética em Uso de Animais Avenida dos Estados, 5001 · Bairro Santa Terezinha· Santo André - SP CEP 09210-580 · Fone: (11) 3356.7632 ceua@ufabc.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 014/2014, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre Hiroaki Kihara, Coordenador da linha de pesquisa Identificação e Caracterização Morfofuncional das Conexinas na Ontogênese Hipocampal de Ratos, utilizando 112 ratos, da qual participam os pesquisadores: Guilherme Shigeto Villar Higa, Pedro Xavier Royero Rodrigues, Erika Reime Kinjo, Bianca Araújo Santos, Marcio Vinicius Damico, Julia Ito e Dominique Vieira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética em uso de animais" da Universidade Federal do ABC e foi aprovado em reunião de 27 de janeiro de 2015, com validade até 31/05/2017.

Santo André-SP, 22 de outubro de 2015.

Profa. Dra. Renata Simões Coordenadora da CEUA - UFABC



DEDICATÓRIA

Aos meus pais Sizuo e Celi, a minha irmã Beatriz, a minha esposa Marcela, e meu padrasto Pedro, pelo incentivo constante, momentos em família, amor, ensinamentos, reconhecimento e apoio diário. Vocês fazem parte desta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Alexandre Kihara, por todos esses anos de convívio, amizade e intenso aprendizado. Agradeço pela grande oportunidade que me proporcionou de trilhar o caminho que sempre sonhei em seguir. Obrigado por promover discussões ricas sobre uma das coisas que mais amo, a ciência e, em especial, a neurociência. Tenho muito orgulho de ter sido seu aluno e participar no processo de estabelecimento de seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Luiz Roberto G. Britto por proporcionar a porta de entrada na pesquisa e por ser sempre uma grande referência.

A todos os funcionários professores do ICB e da neurociência da UFABC pelo constante apoio no nosso trabalho: Profa. Marcela, Valeria, Cayo, José Maria, Luana, Hélvia, entre outros.

Agradeço a todos os meus amigos e amigas do laboratórios do Prof. Alexandre pela amizade e pelo apoio diário em nosso trabalho.

A Erika, pela grande amizade e colaboração que rendeu tantos frutos nesses últimos anos.

A Lais e a Eriquinha, pela ajuda e as animadas discussões sobre temas diversos da neuro. Pessoas que me orgulho por acompanhar sua trajetória e desenvolvimento na vida acadêmica.

Ao Pedro, a Bianca, e toda equipe da epilepsia pela amizade e constante ajuda.

A Silvia por sempre estar disposta a colaborar e discutir sobre o desenvolvimento do sistema nervoso.

A Mariana pelas conversas sobre neurocomputação e ajuda nas análises.

A Vera pela amizade e companheirismo desde o início.

Agradeço a todos pós-graduandos e ICs que já passaram ou ainda estão em nosso grupo... Soha, Márcio, Cayo, Fausto, Vivian, Debora, Juliane, Reza, Mariana, Otávio, Marjorie, Fran, Iza e muitos outros que me ajudaram nessa jornada.

Agradeço ao Prof. Benjamin Whalley por ter me dado a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e por todo conhecimento que me permitiu desenvolver nesse último ano sobre culturas organotípicas, MEA e epilepsia. Agradeço a todos os membros do seu grupo e do staff do prédio Hoppikins da Universidade de Reading, pelo carinho e acolhimento que me ofereceram neste último ano.

Ao Clementino Ibeas, Pabitra Patra e Roshan Limbo pela ajuda, companheirismo e amizade que me promoveram desde o início.

A Laura Lefevre, pela amizade e a sua disponibilidade em sempre ajudar.

A Inês Serra, pela amizade, apoio e pela paixão que compartilhamos pela pesquisa.

A Orla Fannon e a Yuhan Hu pelas brincadeiras e companheirismos nas longas jornadas de preparação das culturas organotípicas e dos incansáveis registros de brain slice.

Ao Michael Bazelot pelo reconhecimento e pela troca constante de conhecimento sobre eletrofisiologia.

A Hong, Saha, Emily e Sara por toda ajuda que tiveram dispostas a me oferecer.

Agradeço principalmente a minha mãe e meu pai por me apoiarem constantemente, de todas as formas, nesses anos de árduo trabalho. Agradeço por permitirem trilhar o que escolhi e me propiciarem tudo que precisei até hoje para chegar até aqui. Agradeço minha irmã Beatriz por trazer a coisinha mais preciosa, minha sobrinha Bibi e pelo apoio moral para continuar nessa jornada.

Agradeço muito a Marcela, o amor da minha vida, por estar sempre ao meu lado e compartilhar os melhores e os piores momentos. Agradeço muito você ter apostado em mim e ter deixado trabalho, família e amigos para viver comigo na Inglaterra nesse último ano. Dedico grande parte desse trabalho a você meu amor.

Agradeço á FAPESP pelo apoio financeiro. em forma de bolsa de doutorado, com o processo número 2012/03583-4 e 2015/17044-6.

"I do not know what I may appear to the world, but to myself I seem to have been only like a boy playing on the seashore, and diverting myself in now and then finding a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me. "

("Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos")

Isaac Newton

RESUMO

Higa, GSV. Caracterização de conexinas neuronais no desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017

Os canais de junções comunicantes (JCs) apresentam um papel importante em processos proliferativos, migratórios e de diferenciação dos neurônios durante o desenvolvimento do sistema nervoso. Durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo, as JCs neuronais estão envolvidas na maturação da circuitaria hipocampal por meio da modulação que exerce sobre a atividade espontânea sincronizada entre neurônios durante este período. As JCs são canais intercelulares compostos pela interação extracelular de hemicanais alocados na membrana citoplasmática de células justapostas. Neste trabalho investigamos a Cx36 e Cx45. conexinas (Cxs) neuronais que constituem as JCs, abundantes no hipocampo de ratos. Nossas análises demonstraram mudanças nos níveis de expressão de transcritos e nos níveis proteicos da Cx36 e Cx45 ao longo do desenvolvimento pósnatal. Por meio da avaliação da distribuição proteica por imuno-histoquímica, identificamos a presença da Cx36 e Cx45 nas diferentes sub-regiões do hipocampo ao decorrer dos períodos analisados, sendo sua ocorrência mais constante na camada de células principais. Além disso, a Cx36, predominantemente localizada próxima ao soma de neurônios da camada de células principais da região de CA1 e CA3, sucede com maior frequência em outras camadas dessas regiões durante a segunda semana após o nascimento. Através das análises de dupla marcação identificamos a Cx36 em neurônios excitatórios da camada de células principais do hipocampo de animais recém-nascidos (P0). Por meio da utilização de marcador para astroglia e Cx45, observamos que essa proteína ocorre com baixa frequência em astrócitos indicando que sua presença possivelmente ocorra predominantemente em neurônios logo após o nascimento no hipocampo. Através da utilização de matrizes de multi-eletrodos (MEA) avaliamos as possíveis alterações da atividade espontânea hipocampal em diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal, sobre o bloqueio abrangente das JCs, assim como de JCs especificamente compostas por Cx36, utilizando o bloqueador carbenoxolona (CBX) e mefloquina, respectivamente. As análises de frequência de potenciais de ação extraídas dos registros eletrofisiológicos extracelulares, demonstraram que o bloqueio inespecífico das JCs diminuem a atividade de áreas hipocampais mais ativas, assim como o de eventos de ≥23Hz em fatias de hipocampo de ratos neonatos (P0-3). Além disso, em fatias de hipocampo de animais entre 8 e 10 dias de vida, CBX promoveu alteração da atividade média de disparo de potenciais de ação no hipocampo como um todo, além de reduzir a atividade de áreas hipocampais com alta atividade e de eventos de ≥23Hz. Curiosamente, o bloqueio das JCs formadas por Cx36 não promoveu alterações na atividade de fatias de hipocampo de animais recém-nascidos (P0-3). Porém, em fatias hipocampais de animais com duas semanas de vida (P8-10), identificamos uma redução de eventos de ≥23Hz, assim como no regime de potenciais de ação de áreas hipocampais mais ativas promovido pela mefloquina. Em conjunto, nossos achados demonstraram que as Cxs neuronais, assim como, o papel das JCs sobre a atividade hipocampal são alteradas durante o desenvolvimento pós-natal, eventos que podem estar relacionados aos mecanismos de regulação de processos fisiológicos que regem o desenvolvimento apropriado do hipocampo.

Palavras-chave: Junções comunicantes. Conexinas. Cx36. Cx45. Desenvolvimento. Hipocampo. Sinapses elétricas.

ABSTRACT

Higa GSV. Characterization of neuronal connexins in the post-natal development of rat hippocampus. [Ph. D. Thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017

Gap junctions (GJ) play a significant role in proliferation, migration, and differentiation of neurons during the development of the nervous system. During postnatal hippocampal development, neuronal GJ is implicated in activity-dependent circuitry maturation promoting modulation of coherent spontaneous neuronal activity. GJ comprise intercellular channels formed by the extracellular interaction of two hemichannels allocated in the cell membrane of apposed cells. These channels promote the intercellular exchange of ions and small molecules (<1kDa). GJ expressed in neurons support the basis of electrical synapses. Here, we investigated two major neuronal connexins (Cx), the proteins that compose the GJ channels, expressed in hippocampus. Rat hippocampal Cx36 and Cx45 were evaluated during the early postnatal period (0-10 days-old), a critical developmental period marked by intense synapse organization and cell proliferation. We identified changes in Cx36 and Cx45 transcript and protein levels during these developmental periods. Interestingly, immunofluorescence analyses showed that Cx36 and Cx45 are expressed in similar concentrations in hippocampal sub-regions throughout the investigated postnatal period and accumulate preferentially in the principal cell layers. Additionally, Cx36 is primarily located near neuronal soma after birth and spread to fiber-rich layers after the second postnatal week. Moreover, we observed that the typical Cx36 immunostaining puncta are densely clustered immediately after birth before becoming diffuse in the second postnatal week. Using double immunostaining, we identified colocalization of Cx36 and CaMKIIa, supporting principal neurons express Cx36 in neonatal hippocampus. Our findings also indicated that Cx45 might be expressed mainly by neurons since it is virtually absent in astrocytes after birth. Using multielectrode array (MEA) we were able to assess the whole hippocampal spontaneous activity in distinct periods of postnatal development under the influence of carbenoxolone (CBX) and mefloquine, an unspecific and Cx36 GJ specific blocker, respectively. Analyses of spike frequency indicated that general GJ blockage reduces the high active hippocampal areas and bursts events (\geq 23Hz) in neonates (P0-3) hippocampal slices. Furthermore, in P8-10 slices, CBX was also able to reduce the mean fire rates of the whole hippocampus, besides the reduction of the activity of high active hippocampal areas and bursts events (\geq 23Hz). Interestingly, we were not able to detect changes in the hippocampal activity in P0-3 slices after Cx36 GJ blockage. Nevertheless, mefloquine was able to reduce bursts events (≥23Hz) and mean fire rate of high active hippocampal areas in P8-10 hippocampal slices. Our results demonstrate a regulation of neuronal Cxs and distinct GJ role in activity modulation during postnatal hippocampal development, which might be essential to physiological processes that govern proper hippocampal development.

Keywords: Gap Junctions. Connexins. Cx36. Cx45. Development. Hippocampus. Electrical Synapses.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1- Secção horizontal da formação hipocampal de rato P9026
Figura 2- Via tri-sináptica da formação hipocampal28
Figura 3- Desenvolvimento morfológico do hipocampo29
Figura 4- Caracterização por microscopia multifóton de três diferentes formas de
atividade espontânea na região CA1 durante o desenvolvimento embrionário e
primeiros dias do período pós-natal35
Figura 5- Principais eventos do desenvolvimento hipocampal de ratos
Figura 6 - Junções comunicantes, hemicanais e conexinas
Figura 7- JCs neuronais42
Figura 8- Procedimento para preparação e registros de fatias de hipocampo em
MEAs
Figura 9- Análise da expressão gênica da Cx36 e Cx45 durante o desenvolvimento
do hipocampo de ratos61
Figura 10- Análise dos níveis proteicos da Cx36 e Cx45 durante o desenvolvimento
do hipocampo de ratos62
Figura 11- Padrão de distribuição da Cx36 em diferentes períodos do
desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos64
Figura 12- Padrão de distribuição da Cx45 em diferentes períodos do
desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos66
Figura 13- Distribuição da Cx36 nas camadas de CA1, nos diferentes períodos do
desenvolvimento pós-natal67
Figura 14- Distribuição da Cx45 nas camadas de CA1, nos diferentes períodos do
desenvolvimento pós-natal69
Figura 15- Distribuição da Cx36 em CA3, nos diferentes períodos do
desenvolvimento pós-natal71
Figura 16- Imunolocalização da Cx45 em CA3, nos diferentes períodos do
desenvolvimento pós-natal73
Figura 17- Distribuição da Cx36 nas subáreas de GD, em diferentes períodos do
desenvolvimento pós-natal74
Figura 18- Distribuição da Cx45 nas camadas do GD, em diferentes períodos do
desenvolvimento pós-natal76

Figura 19- Colocalização de CaMKII e Cx36 na camada de células principais de CA
e GD no hipocampo de ratos P077
Figura 20- Cx45 ocorre preferencialmente em células não-gliais no hipocampo de
ratos P079
Figura 21- Registros de atividade eletrofisiológica de fatias hipocampais de ratos
P0-3 em MEA sobre ação de CBX81
Figura 22- Registros de atividade eletrofisiológica de fatias hipocampais de ratos
P8-10 em MEA sobre efeito de CBX83
Figura 23- Registros de atividade eletrofisiológica de fatias hipocampais de ratos
P8-10 em MEA sobre efeito de mefloquina84
Figura 24- Registros de atividade eletrofisiológica de fatias hipocampais de ratos
P8-10 em MEA sob efeito de mefloquina86
Figura 25- Modulação espaço-temporal das Cxs neuronais na região hipocampal de
CA durante o desenvolvimento pós-natal de ratos96

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Genes investigados e sequência de nucleotídeos dos primers forward e
reverse utilizados na técnica de PCR-Real time. O gene GAPDH foi utilizado como
controle interno51
Tabela 2- Anticorpos (primários e secundários) utilizados para análise de densidade
ótica obtida através da técnica de Western Blot53
Tabela 3- Anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de imuno-
histoquímica54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Lista de abreviaturas e siglas

aCSF- fluído cerebrospinal artificial

ADI- área de interesse

AMPA - receptor do ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AMPc- adenosina monofosfato cíclico

BCA- método do ácido bicinconínico

CA- cornu ammonis

C- celsius

CaMKII- calmodulina quinase II

CaMKIIa- calmodulina quinase II alfa

CBX – carbenoxolona

cDNA- DNA complementar

CEG – eminência gangliônica caudal

CO2- gás carbônico

CT - ciclo limiar

Cx - conexina

CREB - proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc

Da – daltons

DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DCX - doublecrotin

DNA - ácido desoxirribonucleico

DOB - densidade óptica das bandas

DMSO - dimetilsulfóxido

dNTP- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DT - desoxi-timidina

DTT – ditiotreitol

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

ECL- quimiluminescência melhorada

g- gramas

G- constante gravitacional

GABA - Ácido gama-aminobutírico

GCL- camada de células granulares

GFAP- Proteína ácida fibrilar glial

GAPDH - gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase

GD- giro denteado

GDP – potenciais gigantes despolarizantes

Hz- herts

IP₃ - inositol trifosfato

JC - junções comunicantes

kDa- quilodaltons

Kg- quilograma

KHz- quilohertz

KO- knockout

M- molar

M- camada molecular

MAPK - quinases dependentes de mitógeno

MEA - matriz de multi-eletrodos

mg- miligramas

MGE – eminência gangliônica medial

min- minutos

miRNA- microRNA

ml- mililitros

mm- milímetro

mM-milimolar

mV- milivolts

NDS- plasma normal de burro

NGS- plasma normal de bode

nM- nanomolar

nm- nanometro

NMDA - N-metil-D-aspartato

nNOS- óxido nítrico sintetase neuronal

NRSE - elemento silenciador neuro-restritivo

O₂ – oxigênio

PCR- reação em cadeia da polimerase

PB- tampão fosfato

PBS- tampão fosfato salina

PKC – proteína quinase C

PMSF- fenilmetilsulfonil fluoreto

pS – picosiemens

PV- parvalbumina

RIPA- ensaio de radioimunoprecipitação

RNA - ácido ribonucleico

RNAm – RNA mensageiro

SDS - dodecil sulfato de sódio

SPAs- Platôs sincronizados de grupos

seg- segundos

SPy- stratum pyramidale

SR- stratum radiatum

SO- stratum oriens

SLM- stratum lacunosum-moleculare

SL- stratum lucidum

TTBS: solução de tampão Tris- salina com Tween20

TTX- tetrodotoxina

V- volts

ZO-1 – zona ocludente 1

µm- micrometros

µl- microlitros

µg- microgramas

µM- micromolar

 $\mu V - microvolts$

3'UTR- região não traduzível 3'

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO
1.1 Função e anatomia da formação hipocampal25
1.2 Desenvolvimento hipocampal
1.3 Desenvolvimento pós-natal do hipocampo de roedores
1.4 JCs e conexinas
1.5 JCs durante o desenvolvimento do sistema nervoso de roedores42
2 OBJETIVOS
2.1 Objetivos gerais
2.2 Objetivos específicos45
3 MATERIAL E MÉTODOS47
3.1 Modelo animal
3.2 Procedimento de manipulação animal adotado para extração de RNA total e
purificação de proteínas de amostras de hipocampo47
3.3 Procedimento de manipulação animal adotado para avaliação histológica
(histoquímica e imuno-histoquímica)48
3.4 Procedimento de manipulação animal adotado para preparação de fatias de
hipocampo para registro eletrofisiológico48
3.5 Avaliação da expressão gênica de Cxs neuronais por PCR em tempo real48
3.6 Quantificação dos níveis proteicos da Cx36 e Cx45 por western blot51
3.7 Caracterização do padrão de distribuição proteica por imuno-histoquímica53
3.8 Preparação de drogas para utilização em registros eletrofisiológicos in vitro55
3.9 Preparação de fatias de hipocampo para avaliação eletrofisiológica em MEA
3.10 Avaliação eletrofisiológica em MEA56
3.11 Análise dos registros eletrofisiológicos em MEA59
3.12 Análise e estatística
4 RESULTADOS
4.1 Cx36 e Cx45 apresentam perfis distintos de expressão durante o
desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos61
4.2 Análises dos níveis de proteína da Cx36 e Cx45 durante o desenvolvimento pós-
natal do hipocampo de ratos62

4.3 Cx36 e Cx45 estão presentes nas principais regiões que compõe o hipocampo 4.4 Distribuição da Cx36 e Cx45 nas camadas de CA1, em função do período do desenvolvimento pós-natal66 4.5 Distribuição de Cxs neuronais nas camadas de CA3, em diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal69 4.6 Distribuição de conexinas neuronais nas camadas de GD, em função do período do desenvolvimento pós-natal74 4.7 A Cx36 encontra-se presente em células principais de CA e GD do hipocampo de animais recém-nascidos77 4.8 A Cx45 encontra-se predominantemente localizada em células não gliais durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo78 4.9 O bloqueio das JCs por CBX acarreta alterações de atividade de regiões mais ativas assim como de eventos de alta frequência de potenciais de ação (≥23 HZ) em hipocampo de animais neonatos (P0-P3) in vitro80 4.10 O bloqueio das JCs por CBX promove na diminuição de atividade em hipocampo de animais durante a segunda semana de vida (P8-10) in vitro82 4.11 O bloqueio das JCs compostas por Cx36 em fatias de hipocampo neonatos 4.12 O bloqueio das JCs compostas por Cx36 em fatias de hipocampo de animais 5.1 A expressão gênica da Cx36 se apresenta mais elevada no hipocampo durante a 5.2 A Cx45 é altamente expressa durante o desenvolvimento pós-natal do 5.3 Os níveis proteicos da Cx36 e da Cx45 encontram-se reduzidos durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo.....90 5.4 A Cx36 possui distribuição constante em CA1, CA3 e GD durante o em neurônios principais durante desenvolvimento, estando presente 0 desenvolvimento pós-natal do hipocampo91 5.5 A Cx45 está amplamente distribuída no hipocampo durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo, sendo expressa majoritariamente por neurônios no período perinatal93

5.8 Fatias de hipocampo de animais P8-10 apresentam maior sensibilidade a alterações na excitabilidade promovida pelo bloqueio das JCs formadas pela Cx36 ...

5.9 O acoplamento promovido pelas Cxs neuronais promovem a regulação da excitabilidade hipocampal de formas distintas durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo100 A – A new and reliable guide for studies of neuronal Loss based on focal lesion and combinations of in vivo and in vitro approachs......120 B – Reciprocal regulation of epileptiform neuronal oscillations and electrical synapses in the rat hippocampus121 C – Pilocarpine-induced seizures trigger differential regulation of microRNA-stability related genes in rat hippocampal neurons 122 D – Functional role of intracellular calcium receptor inositol 1,4,5-triphosphate type-1 in rat hippocampus after neonatal anoxia123 E- MicroRNAs in neuronal communication124 F - Developmental and functional expression of miRNA-stability related genes in the G – Functional regulation of neuronal nitric oxide synthase expression and activity in H – New insights on temporal lobe epilepsy based on plasticity- related network changes and high-order statistics127 I – Evaluation of possible consequences of Zika virus in fection in the developing nervous system128 K – Copper uptake in mammary epithelial cells activates cyclins and triggers

L – Matrizes Multieletrodo: Apl	icação em biotecnologia	
---------------------------------	-------------------------	--

1 INTRODUÇÃO

1.1 Função e anatomia da formação hipocampal

Ao longo da história foram atribuídas diferentes funções para formação hipocampal. Devido à proximidade anatômica com as regiões responsáveis pelo processamento das informações olfativas, imaginava-se que esta região seria uma parte integrante deste complexo. Já em 1937, James Papez atribuiu parte do processamento da informação emocional ao hipocampo. Outro papel atribuído ao hipocampo foi o controle da atenção, devido à capacidade dessa região originar as ondas teta. Esse padrão de atividade é vinculado a processos cognitivos que levam a aprendizagem (Andersen, 2007). Atualmente, sabe-se que a formação hipocampal contribui para o processamento da memória e aprendizado (especificamente a memória declarativa/explícita, participação no processamento da memória espacial e contextualização), auxiliando na formação e consolidação inicial da memória (Zola-Morgan, et al., 1986, Iversen., 2003, Stark, 2007, Moser, et al., 2015).

A formação hipocampal é uma das áreas mais bem descritas do encéfalo, apresentando trabalhos sobre sua caracterização na ciência moderna a partir dos trabalhos de Ramon y Cajal e Lorente de Nó no início do século 20 (Bayer, 1980b). A formação hipocampal é uma área pertencente ao sistema límbico, derivada de regiões mediais do telencéfalo. Esse grupo de áreas interconectadas é formado por quatro regiões corticais simples, sendo uma das únicas regiões encefálicas que recebem informações sensoriais multimodais de diferentes áreas neocorticais (Swanson, Kohler, 1986). Essa estrutura é composta pelo hipocampo propriamente dito (subdividido em três regiões do cornu ammonis, CA3, CA2 e CA1 e o GD), o complexo subicular (dividido em três regiões, o subículo, pré-subículo e parasubículo) e o córtex entorrinal, que em roedores é geralmente dividido em medial e lateral (Figura 1). A forma tridimensional da formação hipocampal de roedores é relativamente complexa. Trata-se de uma estrutura alongada com longos eixos curvados formando um "C" a partir do núcleo septal-rostral, até o lobo temporal caudal-ventral (Amaral, Witter, 1989).



Figura 1- Secção horizontal da formação hipocampal de rato P90. Fatia contendo as regiões componentes da formação hipocampal GD: giro denteado; ml: camada molecular do giro denteado; gl: camada de células granulares; h: hilo. EC: córtex entorrinal; la: lateral; im: intermediário; me: medial; I-VI: camadas do córtex entorrinal; PA: parasubiculum; PR: *presubiculum*; SU: subiculum. CA1: so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm:*stratum lacunosum moleculare*; CA3: a,b e c; NC: neocórtex; FI: fimbria (barra de escala= 1 mm). Adaptado de Bayer (1980b).

O GD, região integrante da formação hipocampal, é composto por três camadas, sendo essas a camada molecular (M), camada de células granulares (GCL) e o hilo. A camada M, caracterizada pela relativa ausência de corpos celulares, é habitada por dendritos das células granulares, processos dos interneurônios *basket cells* e dos neurônios polimórficos, assim como, ramificações de axônios provenientes do córtex entorrinal e de outras regiões. Essa camada é delimitada pela GCL e a fissura hipocampal. A GCL é definida pela grande concentração de células granulares (células principais do GD) e pela presença de outros tipos celulares, tais como as *basket cells*. O hilo, por sua vez, também conhecida como zona polimórfica do GD ou CA4, é a região central do GD, delimitada pelos braços da GCL. Esta camada é composta por variados tipos de células, sendo as células musgosas os neurônios mais abundantes encontrados nessa região (Amaral D, Lavenex P, 2007).

A região do *cornu ammonis* (CA) é subdivida em quatro ou cinco camadas, dependendo de suas subáreas, CA1 ou CA3. O *stratum oriens* (SO), camada localizada logo abaixo da camada de células piramidais (SPy, infrapiramidal), habita interneurônios tais como as células trilaminares horizontais e as células *oriens-lacunosum-moleculare* (células O-LM), assim como processos provenientes das células piramidais (dendritos basais). Já a

SPy é caracterizada principalmente pelo grande agrupamento de neurônios piramidais, as células principais do CA. O *stratum lucidum* (SL), camada presente apenas em CA3, está localizada logo acima de SPy de CA3. Nesta camada ocorrem as interações entre as fibras musgosas provenientes das células granulares e os dendritos apicais proximais dos neurônios piramidais de CA3. O *stratum radiatum* (SR), por sua vez, é conhecido por residir interneurônios como as células bi-estratificadas, *basket cells* e as células radiais trilaminares. Além disso, nessa camada encontra-se grande parte dos dendritos apicais dos neurônios piramidais, assim como axônios da colateral de Schaffer e da via comissural. Por fim, o *stratum lacunosum-moleculare* (SLM), camada superficial do CA, é caracterizado por apresentar interneurônios inibitórios e projeções provenientes do córtex entorrinal e de outras áreas do sistema nervoso central, como o tálamo (Amaral D, Lavenex P, 2007).

De modo simplificado, a região que abrange a formação hipocampal é conectada por uma única e extensa conexão unidirecional. O GD recebe a maior parte das projeções do córtex entorrinal pela via perfurante. As células granulares do GD projetam, através das fibras musgosas, para a área CA3 do hipocampo. As células piramidais da região CA3 dão origem aos axônios colaterais promovendo conexões associativas entre os neurônios piramidais dessa região. Além disso, os neurônios piramidais de CA3 eferem para a região CA1 do hipocampo através da via colateral de Schaffer. Por sua vez, a região CA1 e a região subicular eferem para o córtex entorrinal, retornando a informação para região de origem (Amaral ,Witter, 1989, Witter, et al., 1989) (Figura 2).

Além da via tri-sináptica, existem outros meios de comunicação estabelecidos entre as áreas que compõem a formação hipocampal. Um exemplo é a participação da área CA2, que realiza sinapses entre a região CA3 e a CA1. Devido a essa condição, a região CA2 estabelece uma via indireta de comunicação entre CA3-CA1, via paralela e alternativa a colateral de Schaffer. Além disso, CA2 ainda recebe aferências provenientes do córtex entorrinal que, por sua vez, envia projeções para a área CA1 onde exerce intensas interações excitatórias. Esta dá origem à via di-sináptica de propagação de informação no hipocampal (Sekino, et al., 1997; Chevaleyre, Siegelbaum, 2010).



Figura 2- Via tri-sináptica da formação hipocampal. Neurônios da camada II do córtex entorrinal projetam para o giro denteado e a subárea CA3 do hipocampo pela via perfurante. Os neurônios da camada III do córtex entorrinal projetam para região CA1 e para o subículo (Sub) pela via perfurante. As células granulares do giro denteado projetam para a região CA3 pelas projeções das fibras musgosas. Os neurônios piramidais de CA3 projetam para a região CA1 através da via colateral Schaffer. Os neurônios piramidais de CA1 para o subículo. Os neurônios de CA1 e do subículo projetam de volta para as camadas profundas do córtex entorrinal. Adaptada de Frostscher M, Seress MFL (2007).

1.2 Desenvolvimento hipocampal

O desenvolvimento da formação hipocampal, assim como outras regiões do sistema nervoso central, apresentam fases distintas que ocorrem de forma sequencial e parcialmente sobreposta. Dentre esses eventos, há a fase de proliferação, migração e diferenciação celular, contidas no estágio inicial de seu desenvolvimento. Estes eventos são seguidos por um período de maturação neuronal, estabelecimento da conectividade e refinamento da comunicação sináptica. Essas fases são promovidas por fatores genéticos preestabelecidos, assim como a contextualização da célula no meio tecidual.

O hipocampo se origina a partir da região dorso-medial do telencéfalo, apresentando padrões de desenvolvimento histológico e celulares filogeneticamente conservados em mamíferos. Esses eventos são concebidos por meio da expressão de genes específicos, como a WNT-3a, que atuam na diferenciação do hipocampo das demais regiões corticais durante o desenvolvimento embrionário. O formato característico do hipocampo adulto ocorre a partir da curvatura do telencéfalo primitivo durante o desenvolvimento encefálico. Em roedores, o neuroepitélio na parede dorso-medial do telencéfalo começa a se curvar no décimo quarto dia do desenvolvimento embrionário (E14), se alocando na parede do ventrículo lateral. A curvatura se torna mais proeminente com a progressão do desenvolvimento embrionário (Figura 3) (Bayer, 1980b, Lee, et al., 2000, Khalaf-Nazzal, Francis, 2013).



Figura 3- Desenvolvimento morfológico do hipocampo. A maior taxa de aumento volumétrico do hipocampo ocorre durante o desenvolvimento embrionário e reduz gradativamente conforme a progressão do desenvolvimento. Durante a primeira semana do desenvolvimento pós-natal, a taxa de crescimento diário é cerca de 30% (P1-P7), decaindo pela metade entre P7 e P21. O aumento do volume hipocampal é acompanhado pela redução do neuroepitélio e a zona sub-ependimal, dando origem às sublâminas componentes do CA e GD. Adaptado de Bayer (1980b).

Os neurônios responsáveis pelo aumento do volume das regiões da formação hipocampal são originados majoritariamente a partir de diferentes regiões contidas no neuroepitélio hipocampal. Os três compartimentos do neuroepitélio responsáveis pela gênese dos neurônios são: neuroepitélio amônico (*Ammonic neuroepithelium*), fonte dos neurônios piramidais do CA; neuroepitélio denteado primário (*primary dentate neuroepithelium*), fonte provedora dos neurônios granulares do GD; e glioepitélio fimbrial (*fimbrial glioepithelium*), que origina as células gliais da fímbria. (Altman ,Bayer, 1990).

A neurogênese ocorrida no neuroepitélio hipocampal segue três principais padrões de gradientes de formação, encontrados nas diferentes regiões do hipocampo. O padrão profundo-superficial, ou de dentro-para-fora, ocorre no CA e no GD. No CA, os neurônios piramidais de SPy obedecem a esse padrão apresentando neurônios originados precocemente na região superficial. No GD, as células presentes no hilo são originadas muito antes que as células granulares, alocadas na região interna do GD. O padrão de distribuição tipo sanduíche também ocorre em ambas as regiões do hipocampo, onde neurônios piramidais contidos em SPy encontram-se flanqueados por células geradas em períodos mais iniciais do desenvolvimento, situadas em SO, SR e SLM. Já no GD, células granulares da GCL são flanqueadas por células mais antigas presentes no hilo e na camada molecular do GD. Além disso, as células mais proximais a fissura rinal começam a ser geradas antes das células proximais do GD. Deste modo, a gênese dos neurônios piramidais de CA1a ocorre antes dos neurônios piramidais de CA3a,b são originas antes dos neurônios principais de CA3c (E18-E20). No GD células granulares da GCL superior surgem antes das células granulares contidas no braço interno (Bayer, 1980a).

Assim que se tornam neurônios pós-mitóticos, as células piramidais originadas a partir dos respectivos nichos do neuroepitélio hipocampal, migram para a região de destino durante o desenvolvimento embrionário do hipocampo. Neurônios piramidais da região CA1 apresentam rota de migração curta, já que o neuroepitélio segue quase completamente a extensão da curvatura do hipocampo. Porém, neurônios piramidais de CA3 apresentam rota de migração mais longa, devido à maior distância entre a fonte e destino dos neurônios formados pelo neuroepitélio hipocampal devem ser posicionados durante o desenvolvimento são processos determinados por programas genéticos específicos preconcebidos (Frotscher M; Seress MFL, 2007).

A formação da camada de células granulares do GD difere em alguns aspectos da formação das camadas de células piramidais do hipocampo. Essas células expressam um gradiente de formação adicional, sendo esta caracterizada pela distribuição diferenciada dos neurônios gerados em diferentes períodos no eixo medial-lateral. O processo de síntese celular que origina as células granulares do GD é mais duradouro que das células piramidais, se estendendo até a vida adulta. Assim, aproximadamente 10% dos neurônios granulares são gerados após P18. A rota de migração das células granulares pós-mitóticas é mais extensa, se comparada a dos neurônios piramidais de CA1 e CA3. A trajetória consiste na partida do neuroepitélio, passando pelo CA já formado (através da estreita zona intermediária entre a camada *alveus* e SO) e o direcionamento para a região ao redor da extremidade de CA3, onde há o início da formação do GD (Bayer, 1980a, Frotscher M; Seress MFL, 2007).

Os neurônios do hilo, assim como as células granulares, são formados a partir de sítios de proliferação celular duradoura, constituindo a principal fonte local das células granulares (Altman; Bayer 1990). Essa fonte é formada pela camada germinal secundária deslocada para o GD. A proliferação celular na região hilar persiste durante todo o período da neurogênese das células granulares. Em roedores, o número total de células hílares rapidamente decresce entre os dias 10 e 25 do período pós-natal, com um paralelo aumento no número de células granulares na GCL, sugerindo que as células recémformadas no hilo deslocam-se para a GCL do GD. Apesar das células granulares apresentarem morfologia uniforme, estas células são originadas a partir de diferentes fontes germinativas (Frotscher M; Seress MFL, 2007).

Os interneurônios hipocampais diferem em termos de procedência e em período de gênese dos neurônios principais do CA e GD. Os interneurônios hipocampais são concebidos na eminência gangliônica medial e caudal (MGE/CGE), localizados no telencéfalo basal (Pleasure, et al., 2000, Butt, et al., 2005, Tricoire, et al., 2011). Interneurônios provindos da MGE são originados entre E9-E12, enquanto a formação das células em CGE ocorre entre E12-E16. Ambos os tipos de interneurônios migram antes dos neurônios principais, estando presente no hipocampo em E14. MGE é fonte de interneurônios somatostatina-, parvalbumina- (PV) e óxido nítrico sintetase neuronal- (nNOS) positivos, incluindo os interneurônios fast-spiking basket ivy cells, bistratified, O-L cells, interneurônios axo-axonais e cells. neurogliaformes. Por sua vez, os interneurônios provindos por CGE dão origem a interneurônios colecistoquinina-, peptídeo intestinal vasoativo-, calretinina e reelina- positivos, incluindo as non-fast-spiking basket cells, interneurônios associados as fibras musgosas, interneurônios associados a colateral de

Schaffer e os interneurônios neurogliaformes (Owens ,Kriegstein, 2002, Hensch, 2005, Bonifazi, et al., 2009).

Os eventos que regem a diferenciação celular, rota migratória e posicionamento dos neurônios hipocampais (região que abrange a CA e GD), são determinados parcialmente por programas genéticos preconcebidos, anterior ao estabelecimento das sinapses. Estudos realizados a partir de intervenções moleculares que geram restrições na expressão de genes específicos, assim como análise de alterações gênicas em síndromes associadas com a má formação do hipocampo, auxiliaram no entendimento dos genes importantes para o encaminhamento dos eventos pertinentes ao desenvolvimento do hipocampo. Dentre esses genes estão *Lsi1* e *Lsi2*, que determinam o subtipo celular caracterizado pelo estabelecimento sináptico em períodos distintos; os genes responsáveis pela expressão do DCX (*doublecortin*), reelina e alfa tubulina 1A (TUBA1A), afetam o processo de laminação do hipocampo (Khalaf-Nazzal ,Francis, 2013, Deguchi, et al., 2011).

1.3 Desenvolvimento pós-natal do hipocampo de roedores

Além dos eventos regidos por programas genéticos que determinam o desenvolvimento hipocampal, existem outros fatores que contribuem na definição da progressão do desenvolvimento do hipocampo. O início da diferenciação neuronal acarreta no surgimento de atividade espontânea recorrente. Esta característica é originada por propriedades biofísicas da membrana de neurônios imaturos que acarreta no desencadeamento de eventos esporádicos de aumento transitório da concentração de cálcio intracelular. Sendo assim, a atividade elétrico/química dos neurônios promove mudanças no meio onde está, influenciando a ativação/inativação de programas genéticos específicos (Ben-Ari, 2001, Crepel, et al., 2007, Blankenship, Feller, 2010).

Durante o período perinatal (P0-P2), uma pequena quantidade de células hipocampais é capaz de gerar atividade espontânea. Dentre as células ativas, uma pequena fração apresenta um padrão de atividade celular diferenciado, caracterizado pelo aumento da duração da elevação transiente da concentração de cálcio intracelular. Este evento gera platôs de atividade elétrica, passíveis de observação em registros eletrofisiológicos. Esses eventos ocorrem de forma recorrente e sincronizada entre pequenos grupos de neurônios. Devido a essas características, este padrão é denominado de platôs sincronizados de grupos (*synchronous plateau assemblies*, SPAs), sendo o primeiro evento de atividade sincronizada que ocorre no hipocampo (Crepel et al., 2007).

Os SPAs são gerados de forma independente das sinapses químicas, porém são altamente dependentes de voltagem. Esse padrão de atividade ocorre devido a correntes intensas de cálcio e sódio geradas pelo canal de cálcio do tipo L e pelos canais de sódio dependentes de voltagem, respectivamente. A sincronização entre a atividade das células que apresentam os SPAs são mediadas pelas junções comunicantes (JCs). Experimentos utilizando bloqueadores de JCs (carbenoxolone e mefloquina) demonstraram que essa via de comunicação intercelular promove a sincronização entre a atividade das células ativas e na quantidade de células ativas que apresentam esse padrão (Crepel et al., 2007).

A transição de uma rede local sincronizada, independente de sinapse química, para uma rede de atividade generalizada determinada pelo estabelecimento da comunicação sináptica, acontece de forma progressiva durante a primeira semana do desenvolvimento pós-natal de roedores. O primeiro padrão de atividade espontânea, provindo pela comunicação sináptica durante o desenvolvimento do hipocampo, é denominado como potenciais gigantes despolarizantes (*giant despolarizant potencial,* GDPs). Tanto os SPAs quanto os GDPs coexistem durante um período crítico do desenvolvimento hipocampal. O bloqueio dos GDPs, por meio da inibição das sinapses químicas, faz com que os disparos sincronizados sejam novamente observados, mostrando que ambos os eventos são realizados de forma independente (Ben-Ari, 2001, Crepel et al., 2007) (Figura 4).

Os GDPs são propagados através de rede de interações entre neurônios, que abrange virtualmente todo hipocampo (região CA1 e CA3 e hilo) durante a primeira e segunda semana do desenvolvimento pós-natal de roedores (P0-P10). Esse padrão de atividade espontânea apresenta um perfil marcado por importantes mudanças na concentração transiente de cálcio, que

ocorre durante os primeiros dias após o nascimento, seguido por um aumento da frequência dos eventos de cálcio com uma gradual diminuição de amplitude (Leinekugel et al., 1997, Strata et al., 1997, Garaschuk et al., 1998).

Os GDPs são padrões de atividade desencadeados pela ação sinérgica despolarizante dos neurotransmissores ácido y-aminobutírico (GABA) e do glutamato. A ação despolarizante do GABA, sobre o receptor ionotrópico GABA_A, é gerada a partir da alta concentração intracelular de cloreto (CI). Essa característica é atribuída à expressão temporal diferenciada de dois transportadores de Cl⁻ durante o desenvolvimento do sistema nervoso, o KCC2 e NKCC1. O transportador KCC2, proteína que promove a remoção do Cl para o meio extracelular, é expresso tardiamente em relação ao transportador NKCC1 durante o desenvolvimento. Como resultante o Cl⁻ acumula no meio intracelular. Sendo assim, a ativação do receptor GABA_A acarreta na saída do CL intracelular, desencadeando a despolarização do neurônio. Α despolarização inicial gerada pelo GABA remove o magnésio situado no receptor NMDA, possibilitando sua ativação pelo glutamato (Ben-Ari et al., 2007).

Em roedores, esse padrão de atividade espontânea envolve células piramidais e interneurônios GABAérgicos situados em CA3 e CA1, assim como interneurônios presentes no hilo. Este evento é mais propício de ocorrer em CA3, afetando outras áreas através da comunicação neuronal que envolve a ativação de receptores GABA_A e NMDA. As GDPs ocorrem entre três e quatro por segundo, sendo determinada por lento eventos um potencial hiperpolarizante. A hiperpolarização é ditada por canais de potássio ativados pela elevação de cálcio intracelular gerado pela despolarização durante a ativação sináptica. O correlato das GDPs em experimentos conduzidos in vivo são as sharp waves (SPW), observadas em diferentes condições em ratos neonatos (Strata et al., 1997, Leinekugel et al., 2002, Sipila et al., 2005, Sipila et al., 2006, Blankenship; Feller, 2010).



Figura 4- Caracterização por microscopia multifóton de três diferentes atividade espontânea na região CA1 formas de durante 0 desenvolvimento embrionário e primeiros dias do período pós-natal. (A1) imagens de cálcio provindas de fatias da região CA1 do hipocampo de camundongo (E16, P1 e P6). (A2) Detecção automática de contornos de células a partir de imagens de fluorescência. Contornos sem preenchimento indicam células sem atividade. Células com preenchimento preto indicam células que produzem picos de atividade de cálcio; células contendo preenchimento vermelho representam neurônios que produzem platôs de atividade de cálcio (células SPAs); células preenchidas de azul são neurônios que produzem transientes de cálcio rápidos e sincronizados (GDPs). Barra de escala 100 µM. (A3) Representação de atividade de três registros das áreas demonstradas em A1. Cada linha representa um único neurônio, sendo cada traço horizontal a duração do transiente de cálcio detectado. (A4) Três tipos de eventos podem ser discriminadas, como mostrado pela sua representação de traços gerados a partir de variações na fluorescência (preto, picos de cálcio; vermelho, platôs de cálcio; azul, GDPs). (B1) Current-clamp simultâneo (V repouso: ~-60 mV, topo) e registros ópticos (traço abaixo) em três neurônios representativos para os três tipos de atividade de cálcio descritos em A. Adaptada de Crepel et al. (2007)

O surgimento dos padrões de atividade espontâneos sincronizados é desencadeado pelo início da formação da circuitaria hipocampal, definida pelo estabelecimento e refinamento da comunicação entre os neurônios. Este
episódio auxilia a determinar as alterações neuronais que contribuem para o desenvolvimento pós-natal do hipocampo. Durante este período, neurônios granulares do GD estão em intenso processo de formação, migração e formação de seus axônios, as fibras musgosas. A propagação das GDPs, que afetam os neurônios acoplados do hilo, desencadeia a liberação de GABA, que atua como fator trófico importante na migração e maturação dos neurônios granulares do GD (Strata et al., 1997).

Ao contrário dos neurônios granulares do GD, a gênese e migração dos interneurônios e neurônios de projeção de CA já se encontram estabelecidos após o nascimento em roedores. Apesar disso, essas células sofrem intensas modificações que levam ao amadurecimento das funções necessárias para execução de atividades cognitivas, expressas durante a vida adulta. As arborizações dendrítica e axonal, que começam a se desenvolver durante o período embrionário, atingem seu nível máximo de maturação durante o desenvolvimento pós-natal, assim como o surgimento de espinhas dendríticas e, consequentemente, a formação e o refinamento das sinapses (Figura 5).



Figura 5- Principais eventos do desenvolvimento hipocampal de ratos. Os neurônios piramidais de CA são gerados antes do nascimento e sofrem processo de maturação durante o primeiro mês do desenvolvimento pós-natal. Os neurônios começam a estabelecer comunicação durante o período perinatal (* indica o dia aproximado do nascimento- E21). Durante as duas primeiras semanas após o nascimento, a maior parte da atividade sináptica apresenta padrões de atividade imaturo, seguido do surgimento de padrões de atividade encontrados em animais adultos. Fonte: Adaptado de Ben-Ari (2001).

O desenvolvimento da arborização dendrítica dos neurônios hipocampais é dada majoritariamente durante o desenvolvimento pós-natal. Logo após o nascimento, cerca de 80% dos neurônios piramidais de CA1 apresentam um pequeno soma e dendritos apicais pouco desenvolvidos. (Pokorny; Yamamoto, 1981, Tyzio et al., 1999). A comunicação neuronal estabelecida durante o desenvolvimento auxilia de forma importante no amadurecimento dos neuritos das células do hipocampo. As flutuações na concentração de cálcio intracelular, providas pelo aumento da comunicação neuronal durante o desenvolvimento hipocampal, levam a ativação de proteínas específicas, como a cálcio-calmodulina quinase (CaMK) e as quinases dependentes de mitógeno (MAPK). Ambas as famílias de proteínas quinase, e suas respectivas isoformas, atuam na regulação do crescimento e estabilidade de neuritos através da interação direta com o citoesqueleto, ou pela regulação da expressão de genes como a CREB (Wu et al., 2001, Redmond et al., 2002, Fink et al., 2003). Estudos avaliando o crescimento de neuritos em culturas organotípicas de hipocampo demonstraram que a frequência das oscilações da concentração de cálcio, propiciadas pela atividade espontânea durante o desenvolvimento hipocampal, exercem influência sobre o crescimento e estabilidade dos neuritos (Lohmann et al., 2005).

Assim, a atividade neuronal que ocorre durante o desenvolvimento do hipocampo, auxilia no refinamento de circuitos preestabelecidos por meio da formação/eliminação de sinapses. As GDPs atuam no fortalecimento seletivo de sinapses estabelecidas entre o GD-CA3 (via fibras musgosas), assim como na comunicação sináptica entre CA1-CA3 (via colateral de Schaffer). Além disso, a atividade espontânea atua na eliminação de sinapses, propiciando a seleção de sinapses específicas. O bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependente, responsáveis pela gênese dos potenciais de ação durante o início do desenvolvimento pós-natal de ratos (P3), ocasiona o aumento da quantidade de sinapses funcionais, como também da expressão de proteínas pertinentes a essa estrutura (sinapsina I, sinaptofisina, GluR1 e AMPA) (Lauri et al., 2003, Mohajerani; Cherubini, 2006).

A partir desses mecanismos, a atividade espontânea generalizada propicia a determinação do local preciso de ocorrência das sinapses nos ramos dendríticos das células piramidais do hipocampo. Com isso, esse padrão de atividade espontânea atua na formação de agrupamentos sinápticos provenientes de fontes distintas. O agrupamento sináptico altera a forma de processamento e armazenamento de informação, já que sinapses ativadas em uma mesma região dendrítica apresentam uma maior propensão em gerar potencial de ação, se comprada a uma ativação do mesmo número de sinapses localizada em ramos dendríticos distintos. Sendo assim, a inibição dos receptores NMDA, ou da atividade neuronal durante o desenvolvimento hipocampal, acarreta na dispersão das sinapses provenientes de fontes específicas sobre os ramos dendríticos das células piramidais, acometendo na perda parcial da integração de sinal em neurônios individuais, assim como na manutenção da organização topológica por meio de diferentes nichos de processamento de informação do hipocampo (Kleindienst et al., 2011).

Deste modo, o estabelecimento das interações neuronais propiciados pela maturação dos neurônios durante o desenvolvimento pós-natal, atua como fator regulador dos programas gênicos preestabelecidos, possibilitando o desencadeamento de eventos que levam a formação e o refinamento apropriado das redes neuronais. Sendo assim, os mecanismos de comunicação neuronal, sejam esses sinápticos ou não sinápticos, atuam como importantes meios de regulação do desenvolvimento pós-natal, controlando diversos fatores, como os níveis de comunicação e excitabilidade do hipocampo (Galvan et al., 2000).

1.4 JCs e conexinas

As JCs são estruturas formadas a partir da junção de dois canais alocados na membrana de duas células distintas, conectadas no espaço extracelular. As células que contribuem para a formação desse canal estabelecem comunicação direta através dessa estrutura. As JCs são dispostas em agrupamentos de dezenas a milhares de canais intercelulares localizados em regiões específicas da superfície celular, denominadas de placas de JCs. Essa estrutura é concebida a partir de canais unitários, denominados hemicanais ou conexônios. Cada hemicanal é formado por seis unidades proteicas, chamadas conexinas (Cxs) (Maeda; Tsukihara 2011). As Cxs se arranjam formando um poro hidrofílico central no hemicanal, permeável a íons e moléculas com massa de até 1 kDa. Dessa forma, moléculas como o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e o inositol trifosfato (IP₃) são passíveis de atravessar os hemicanais. Além de formarem canais de JCs, os hemicanais podem atuar como unidades funcionais independentes (Jiang; Gu, 2005, Spray et al., 2006).

Cada molécula de Cx atravessa quatro vezes a membrana citoplasmática, formando duas alças extracelulares (E1 e E2), quatro domínios transmembrânicos (TM1 a TM4) e dois segmentos citoplasmáticos, o segmento carboxi e amino terminal. As alças extracelulares, E1 e E2, possuem cada uma delas três resíduos de cisteína, que são passíveis de realizar ligações dissulfídicas entre as alças extracelulares de Cxs presentes em células próximas, constituindo sítios importantes para a formação de um canal funcional de JC (Figura 6) (Bao et al., 2004).



Figura 6- Junções comunicantes, hemicanais e conexinas. (A) Diferentes estados das JCs. As JCs podem ser encontradas com o poro hidrofílico aberto ou fechado. (B) Os canais de JC podem ser constituídos por dois hemicanais distintos ou homólogos, sendo classificados como homotípicos ou heterotípico, respectivamente. Da mesma forma, os hemicanais podem ser constituídos por conexinas distintas ou homólogas, classificadas como homoméricos ou heteroméricos. (C) As JCs são formadas por dois hemicanais situados em duas células distintas conectados no espaço extracelular. (D) As conexinas são proteínas integrais de membrana que atravessam quatro vezes a membrana citoplasmática, formando duas alças extracelulares (E1 e E2), quatro domínios transmembrânicos (TM1-TM4) e dois segmentos citoplasmáticos, o segmento carboxi (CT) e amino terminal (AT). Os segmentos TM2 e TM3 das Cxs formam uma alça citoplasmática (CL). Adaptado de Nielsen et al., 2012.

Os segmentos M2 e M3 das Cxs formam uma alça intracelular (CL), em que o comprimento e homologia são utilizados para classificar as Cx em diferentes subgrupos (α , β , γ , $\delta \in \varepsilon$). Sendo assim, cada Cx é identificada pela abreviatura de *gap junction* (junção comunicante), GJ, a letra grega que representa o grupo em que se enquadra e o número que representa a ordem de sua descoberta. O nome das Cxs é atribuído de acordo com seu peso molecular. Por exemplo, a Cx43 é assim denominada devido ao seu peso molecular de 43 kDa e classificada como GJa1, por ser a primeira Cx a ser caracterizada do grupo α (Nielsen et al., 2012).

As Cxs são uma família de proteínas que abrangem 21 diferentes genes no genoma humano e 20 em camundongos. As diversas isoformas de Cxs apresentam propriedades fisiológicas e resposta a regulação de forma diferenciada. As Cxs são capazes de formar hemicanais compostos por diferentes Cxs ou pelo mesmo tipo de Cx, determinada pela expressão e nível de afinidade entre essas unidades. Deste modo, as Cxs podem formar dois tipos de hemicanais: hemicanais compostos por dois tipos distintos de Cxs, denominado heterotípico; ou formados por um único tipo de Cx, chamados homotípico. Do mesmo modo, as JCs podem ser formadas por dois tipos distintos de hemicanais ou pelo mesmo tipo de canal, sendo classificados como quando formados por diferentes tipos de hemicanais heterotípico, e quando formado pelo mesmo tipo de hemicanais, homotípico (Figura 6). A variedade de combinações proporciona uma diversidade na função e composição dos canais de JCs presentes no organismo (Willecke, et al., 2002, Bloomfield, Volgyi, 2009, Maeda, Tsukihara, 2011,).

De forma simplificada, as JCs podem apresentar dois estados distintos, aberto e fechado. Diferentes mecanismos atuam na regulação desses estados definindo a permeabilidade das JCs. Os fatores regulatórios podem ser determinados por alterações da concentração de hidrogênio (pH), concentração de cálcio intra/extracelular, interações com moléculas, ou até mesmo a diferença de voltagem existente entre as células acopladas (Burt, 1987, Bukauskas, Verselis, 2004, Peracchia, 2004).

As JCs são encontradas em todos os tecidos de vertebrados, com exceção das células do tecido muscular esquelético. No sistema nervoso de

roedores foram identificadas expressas 11 diferentes Cxs, entre essas poucas são expressas em células neuronais. Entre as Cxs presentes em neurônios estão a Cx36 e a Cx45. A Cx36 é composta por 321 aminoácidos, sendo expressa pelo gene GJD2 localizado no segundo cromossomo de camundongos. Devido as suas características estruturais, essa proteína é classificada como pertencente do subgrupo δ . As Cxs formam hemicanais homoméricos e JCs homotípicas que apresentam baixa condutância (~14 pS) e baixa sensibilidade a diferença de voltagem transjuncional. As JCs formadas pelas Cx36 no sistema nervoso estão transcritas principalmente em neurônios, sendo sua proteína geralmente associada a outras proteínas como a zona ocludente 1 (ZO-1) e as JCs formadas por Cx45 (Srinivas et al., 1999, Al-Ubaidi et al., 2000, Li et al., 2008, Li et al., 2004).

A Cx45, a primeira Cx do identificado do subgrupo γ, apresenta 396 aminoácidos, sendo expressa pelo gene GJC1 localizado no décimo primeiro cromossomo de camundongos. As JCs formadas pela Cx45 apresentam relativa baixa condutância (~26 pS) e alta sensibilidade a voltagem. Apesar de ser expressa em neurônios, a Cx45 não é exclusivamente presente em neurônios, estando localizada em células gliais (Kunzelmann et al., 1997, Baldridge et al., 2001, Valiunas, 2002, Maxeiner et al., 2003, Zahs et al., 2003, Chapman et al., 2013).

As JCs quando sucedidas em neurônios são responsáveis pelas sinapses elétricas, papel possibilitado por sua capacidade de mediar a troca de íons entre as células acopladas. Sendo assim, a comunicação neuronal, via JC, atua de forma importante em processos patológicos (Paschon; Higa et al. 2012; Kinjo, Higa et al. 2014) e fisiológicos, como consolidação de memória, sincronização neuronal e no desenvolvimento do sistema nervoso (Figura 7) (Deans et al., 2001, Hormuzdi et al., 2001, Montoro, Yuste, 2004, Kihara et al., 2010, Wang, Belousov, 2011, Belousov, Fontes, 2013).



Figura 7- JCs neuronais. As JCs neuronais podem ser constituídas por algumas Cxs específicas relacionadas na tabela (esquerda). As Cxs neuronais podem constituir hemicanais funcionais independentes ou canais de JCs funcionais, constituindo as sinapses elétricas. As JCs neuronais permitem a troca de íons e pequenos metabólitos entre os neurônios acoplados. Os hemicanais realizam a troca de íons e pequenos metabolitos com o meio extracelular. Adaptado de Belousov et al. (2013).

1.5 JCs durante o desenvolvimento do sistema nervoso de roedores

As Cxs, proteínas responsáveis pela formação das JCs, apresentam-se dinamicamente expressas durante todo o ciclo de vida de vertebrados. Durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal do sistema nervoso central de roedores, as Cxs neuronais apresentam níveis variados de expressão, que são determinados pelo período e região do sistema nervoso (Dermietzel, Traub et al. 1989; Nadarajah, Jones et al. 1997; Belluardo, Mudo et al. 2000). Muitos estudos indicam que a via de comunicação pelas JCs auxilia nos processos que governam o desenvolvimento apropriado do sistema nervoso. Durante o desenvolvimento embrionário, as JCs apresentam papel importante na proliferação, migração e diferenciação dos neurônios (Cheng et al., 2004, Elias et al., 2007, Cook, Becker, 2009, Kihara et al., 2010, Hartfield et al., 2011).

No hipocampo foi identificado o acoplamento via JCs entre as células glia radiais-símile (*glia radial-like*), que apresentam características semelhantes às células-tronco, responsáveis pela geração de células gliais e neurônios granulares no GD de hipocampo adulto. A comunicação intercelular via JC propicia a regulação da neurogênese nesta região hipocampal. Essa informação foi acessada por meio da restrição do acoplamento pela deleção

dos genes das Cxs formadora das JCs neste tipo celular, resultando na diminuição da proliferação dessas células no GD. Apesar das investigações serem conduzidas com foco na neurogênese adulta, as JCs poderiam contribuir da mesma maneira durante o desenvolvimento do hipocampo (Kunze et al., 2009).

Além disso, as JCs neuronais atuam de forma importante no surgimento e refinamento das circuitarias neuronais durante o desenvolvimento do sistema nervo central. Durante o período perinatal, inicia-se a formação de uma rede excitatória transiente relacionada com a atividade espontânea sincronizada. A rede de atividade espontânea é observada em diferentes regiões durante o desenvolvimento, incluindo a medula espinal, retina e hipocampo. Essas redes são formadas por combinações de diversos mecanismos, como a ação despolarizante do GABA, formação de conexões sinápticas transientes, transmissões extrasinápticas e acoplamento via JC. Este padrão de atividade do desenvolvimento atua de forma importante na condução apropriada do desenvolvimento do sistema nervoso (Personius et al., 2007; Blankenship; Feller, 2010).

Durante o desenvolvimento da medula espinal, as JCs são responsáveis por mediar o acoplamento dos motoneurônios. O estabelecimento dessa via de comunicação auxilia na modulação da atividade sincronizada entre esse tipo neuronal. Durante o desenvolvimento, a sincronização temporal na atividade dos motoneurônios é reduzida, porém este processo ocorre de forma prematura em camundongos Cx40^{-/-}. A redução no acoplamento elétrico e da correlação temporal da atividade dos motoneurônios em camundongos *knockout* (KO) para Cx40 diminuem a inervação múltipla durante o período perinatal. Deste modo, as JCs, através da modulação dos padrões de atividade espontânea dos motoneurônios, atuam de maneira significativa para formação das sinapses neuromusculares durante o desenvolvimento (Personius et al., 2007).

Na retina, padrões de atividade espontâneas são registrados em células ganglionares durante o desenvolvimento. Esses eventos são realizados por meio da ativação de disparos espontâneos propagados célula-a-célula, denominados de ondas retinianas. O bloqueio da atividade espontânea altera

os padrões sinápticos estabelecidos entre as células ganglionares com o núcleo geniculado lateral do tálamo, indicando que a atividade espontânea gerada na retina apresenta um papel crítico no desenvolvimento adequado do sistema visual adulto (Roerig, Feller, 2000).

As JCs também estão envolvidas na geração das ondas retinianas de pintos. Em diferentes períodos do desenvolvimento retiniano, fármacos conhecidos por bloquear a comunicação via JCs restringem a propagação das ondas retinianas. Em retinas de camundongos KO para a Cx36 e Cx45, apesar de ser observado o aumento do número de potenciais de ação ocorridos de maneira desincronizada, não foi notado a extinção completo da atividade, demonstrando que as Cx45 e Cx36 não são necessárias para a propagação das ondas retinianas. Curiosamente, a restrição da expressão de apenas um dessas Cxs não altera de forma significativa os padrões de propagação das ondas da retina (Blankenship et al., 2011).

Estudos realizados no hipocampo de roedores evidenciaram que os diferentes padrões de atividade identificados durante o desenvolvimento pósnatal são dependentes ou modulados pelas JCs. Apesar desses estudos evidenciarem a importância deste tipo de comunicação para o estabelecimento da atividade sincronizada, ainda não há trabalhos sobre o papel de Cxs específicas e sua contribuição individual para modulação desses eventos (Strata et al., 1997, Crepel et al., 2007, Molchanova et al., 2016,).

Em diversas regiões do sistema nervoso, as JCs podem atuar como potenciais substratos para a propagação de íons e pequenas moléculas sinalizadoras que regulam a progressão adequada do desenvolvimento. No hipocampo, apesar de muitos estudos apontarem a presença de acoplamento neuronal, assim como seu papel em mediar os padrões de atividade espontâneos sincronizados, estudos detalhados sobre a distribuição de Cxs neuronais específicas, assim como seu papel na regulação da atividade hipocampal em função do desenvolvimento hipocampal ainda precisam ser elucidadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Visto que, durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo as JCs atuam como uma importante via de comunicação entre os neurônios, nossos objetivos visam caracterizar a Cx36 e Cx45 durante o desenvolvimento do hipocampo de ratos. Além disso, nossos objetivos contemplam identificar a participação das JCs sobre a excitabilidade hipocampal durante períodos distintos do desenvolvimento pós-natal.

2.2 Objetivos específicos

• Quantificar por PCR em tempo real os níveis de RNA mensageiro (RNAm) da Cx36 e Cx45 de hipocampos de ratos P0, P5, P10 e P60;

• Quantificar por *Western Blot* os níveis proteicos da Cx36 e Cx45 de hipocampos de ratos P0, P5, P10 e P60;

 Analisar por imuno-histoquímica o padrão de distribuição da Cx36 e Cx45 na região de CA1, CA3 e GD, durante os períodos que compreendem o desenvolvimento pós-natal, P0, P5, e P10;

Analisar por imuno-histoquímica o padrão de distribuição da Cx36 e
Cx45 nas camadas de CA1, CA3 e GD, durante os períodos que compreendem o desenvolvimento pós-natal, P0, P5, e P10;

 Analisar por imuno-histoquímica os níveis de colocalização da Cx45 e o marcador astroglial (proteína ácida fibrilar glial; GFAP) em hipocampos de animais P0;

 Analisar por imuno-histoquímica os níveis de colocalização da Cx36 e o marcador de neurônios excitatórios (CaMKIIα) no hipocampo de animais P0;

 Avaliar o efeito dos bloqueadores das JCs, carbenoxolona (CBX) e mefloquina, sobre a frequência média de potenciais de ação em fatias de hipocampo de animais P0 e P3; assim como em fatias provindas de animais P8-10, por meio de registro eletrofisiológicos utilizando matriz de multi-eletrodo (MEA). Avaliar o efeito dos bloqueadores das JCs, carbenoxolona (CBX) e mefloquina, sobre a frequência média de potenciais de ação de áreas hipocampais com elevada atividade espontânea em fatias de hipocampo de animais P0 e P3; assim como em fatias hipocampais de animais P8-10, por meio de registro eletrofisiológicos utilizando MEA

 Avaliar o efeito dos bloqueadores das JCs, carbenoxolona (CBX) e mefloquina, sobre a frequência média de eventos de ≥23 Hz em fatias de hipocampo de animais P0 e P3; assim como em fatias hipocampais de animais P8-10, por meio de registro eletrofisiológicos utilizando MEA.

 Avaliar o efeito dos bloqueadores das JCs, carbenoxolona (CBX) e mefloquina, sobre quantidade de eletrodos ativos em fatias de hipocampo de animais P0 e P3; assim como em fatias hipocampais de animais P8-10, por meio de registro eletrofisiológicos utilizando MEA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo animal

Utilizamos ratos machos (Rattus novergicus) da linhagem Long-Evans, coletados no dia do nascimento (P0), assim como em idades intermediarias até 10 dias após o nascimento (P0, P1, P2, P3, P5, P8, P9 e P10). Além disso, utilizamos animais com 60-90 dias de vida, período de maturação avançado da estrutura hipocampal, característico do estágio adulto. Os animais utilizados para estudos histológicos, avaliação proteica e avaliação de expressão gênica foram provindos pelo Biotério de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério da UFABC, localizado no campus de São Bernardo do Campo (SP). Animais usados para análise de atividade eletrofisiológica nasceram e foram mantidos no biotério da Universidade de Reading, Inglaterra. Os animais foram mantidos em temperatura controlada (20-22 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Receberam alimentação balanceada e água ad libitum. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e pela comissão de Bioética da Universidade Federal do ABC (protocolo 014-2014).

3.2 Procedimento de manipulação animal adotado para extração de RNA total e purificação de proteínas de amostras de hipocampo

Para realização da coleta de hipocampos destinados para métodos de extração de RNA e proteína total, submetemos os animais à eutanásia por meio do método de decapitação, com a posterior remoção de ambos os hipocampos. Esse procedimento consiste na anestesia de animais adultos com 10 mg/Kg de cloridrato de xilazina e 100 mg/kg de cloridrato de quetamina, antes do procedimento de decapitação. Já animais neonatos com idade entre P0 a P10 foram decapitados sem a veiculação prévia de anestésicos.

3.3 Procedimento de manipulação animal adotado para avaliação histológica (histoquímica e imuno-histoquímica)

Para avaliação das proteínas estudadas em seu contexto tecidual, os animais utilizados foram submetidos à perfusão, após serem anestesiados com 10 mg/Kg de cloridrato de xilazina e 100 mg/kg de cloridrato de quetamina. O método de fixação tecidual por perfusão foi adaptado da publicação de Nagy (2012). O método consiste na perfusão transcardiaca de 40 ml de solução préfixadora para ratos adultos, e 10 ml para ratos recém-nascidos. A solução préfixadora é composta de 25 mM de tampão fosfato de sódio, cloreto de sódio 0.9%, nitrito de sódio 0,1% e 1 unidade/ml de heparina, a 4 °C (pH 7,0). Em seguida, os ratos foram submetidos à perfusão de solução fixadora condicionada a 4 °C (ratos adultos=200 ml, ratos neonatos=30 ml). Solução composta por 0,16 M de tampão fosfato de sódio (pH 7,0), 1% de formaldeído e 0,2% de ácido pícrico. Logo após, os ratos foram submetidos à perfusão de solução pós-fixadora. Essa solução é composta por tampão fosfato de sódio 25 mM e 10% de sacarose. Após esse procedimento, os encéfalos dos animais foram removidos e condicionados por 12-48 horas (4 °C) em solução pósfixadora, seguido de congelamento em meio de inclusão (OCT, Optimum Cutting Temperature, Tissue-Tek) (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, EUA) para realização de cortes histológicos.

3.4 Procedimento de manipulação animal adotado para preparação de fatias de hipocampo para registro eletrofisiológico

Para realizarmos a preparação de fatias hipocampais de animais neonatos (P0-3; P8-10) os animais foram submetidos ao deslocamento cervical seguido de decaptação de acordo com a regulamentação (Scientific Procedures) Act, 1986 do *Home Office* britânico.

3.5 Avaliação da expressão gênica de Cxs neuronais por PCR em tempo real

Os níveis relativos de expressão gênica das Cxs neuronais durante o desenvolvimento hipocampal foram acessados pelo método de PCR em tempo real. Foram utilizados oito animais de cada período do desenvolvimento e oito animais adultos para realização desse estudo (P0=8, P5=8, P10=8, P60=8;

n=8). Para isso, ambos os hipocampos extraídos de cada animal foram condicionados em 1 ml de TRIzol® (Life-Invitrogen, EUA), sendo posteriormente homogeneizados com auxílio de sonicador. Ao resultante desse processo, foram adicionados 200 µl de clorofórmio e, logo após, centrifugadas (12000 G, a 4° C) durante 15 minutos. Após a centrifugação foram obtidos três diferentes fases, sendo reservada a fase translúcida superficial. Depois de adicionado 500 µl de isopropanol, as amostras foram submetidas à centrifugação (10000 G a 4 ° C; por 10 minutos) dando origem a um precipitado constituído pelo RNA total da amostra. Depois de descartado o sobrenadante, foi adicionado 1,0 ml de etanol (75%), e as amostras foram novamente centrifugadas (7500 G a 4° C) por 10 minutos. A fase translúcida superficial foi excluída, preservando-se apenas o precipitado de RNA. O precipitado foi ressuspenso utilizando 20 µl de água com ausência de nucleases (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Para avaliar a concentração do RNA total extraído, cada amostra foi submetida a espectrofotometria, utilizando 260 nm de comprimento de onda. Antes da realização do protocolo de transcrição reversa, as amostras foram tratadas com DNAse Amplification Grade (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para eliminar os resíduos de DNA das amostras.

Para realização da transcrição reversa, convertendo o RNA total em cDNA do RNA mensageiro, foi utilizado a enzima M-MLV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para ambos os procedimentos foram adotados o protocolo fornecido pelo fabricante (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Esse procedimento consiste na utilização de 3 µg de RNA total adicionados a 1,0 µl de oligo dT (0,5 µg; Invitrogen, EUA), junto a 1,0 µl de uma mistura de nucleotídeos (dNTP mix- 10 mM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) incubados por 65 °C por 5 minutos. Logo após foram adicionados 4 µl de tampão (5x buffer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), 2 µl de DTT (0,1 M, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), 1,0 µl *RNAse out* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e 1,0 µl de M-MLV incubadas por 55 minutos a 37 °C, seguida de uma segunda incubação de 15 minutos a 70 °C.

O cDNA resultante das amostras de hipocampo foram submetidas à técnica de PCR em tempo real. Neste sistema, a amplificação da sequência alvo é demonstrada pela emissão de fluoróforo, resultante da formação de dupla fita na região codificada pelo par de *primers*. A quantificação da amplificação é feita pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho.

A experimentação por PCR em tempo real foi concebida a partir da utilização do sistema SYBR Green, especificamente o reagente *goTaq qPCR Master Mix* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), juntamente a 100 nM de *primers* específicos para Cx36 e Cx45 e GAPDH (gene utilizado como controle interno) e 5 ng de amostras de cDNA. A reação consiste pela liberação de fluorescência proporcional ao número de cópias, oriunda graças a intercalação do fluoróforo pela dupla fita em cada fase de anelamento. A validação do resultado se dá pela curva de dissociação, onde o produto do PCR é aquecido de 60 °C até 90 °C, o que leva à separação da dupla fita e, consequentemente, a diminuição da fluorescência. Com a curva de dissociação, é possível determinar a especificidade da amplificação propiciada pelos *primers*.

Os *primers* utilizados para averiguação da alteração da expressão dos genes das Cx36 e Cx45 foram obtidos de acordo com a sequência descrita por Kihara et al. (2010). A quantificação relativa dos genes de interesse foi realizada utilizando o método do CT comparativo, como descrito (Kihara; Santos et al. 2008). O valor do CT foi determinado subtraindo os valores do CT de cada amostra, da média dos respectivos valores do CT do gene adotado como controle interno. O cálculo do $\Delta\Delta$ CT foi gerado por meio da subtração de cada Δ CT dos grupos controle. Os valores obtidos foram normalizados por meio da subtração da média do $\Delta\Delta$ CT de animais P60.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	
Cx36	GGGGAATGGACCATCTTTGGA	TCCCCTACAATGGCCACAAT	
Cx45	GGGTAACGGAGGTTCTGGT TACAGGGTTGTCTACGCCGCC	AAGCTCCAACTCATGGTGGT	
GAPDH	TTCAAAAGAGGGCGCACTTC	GCGCACTCTGGTTTTTATTTCA	

Tabela 1. Genes investigados e sequência de nucleotídeos dos *primers forward* e *reverse* utilizados na técnica de PCR-Real time. O gene GAPDH foi utilizado como controle interno.

3.6 Quantificação dos níveis proteicos da Cx36 e Cx45 por western blot

A avaliação de presença e modulação dos níveis das proteínas investigadas durante o desenvolvimento do hipocampo foi conduzida com a utilização de amostras de seis animais adultos e seis animais dos respectivos períodos do desenvolvimento avaliados (n=6). Ambos os hipocampos de cada animal utilizado foram diretamente coletados e colocados em tampão RIPA (Tris 7,4 pH 10 0mM, EDTA 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml), seguido de maceração com auxílio de sonicador. O material resultante foi submetido à centrifugação (12000 G a 4 °C, por 30 minutos) obtendo-se duas fases distintas, em que utilizamos o sobrenadante. Parte do volume obtido do material em suspenção de cada amostra foi diluído a 1:10 em água ultra pura. A concentração de proteína total foi acessada por meio da aplicação do método BCA (*BCA Protein Assay*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Depois de obtido os valores de concentração, as amostras foram diluídas (100 µg de proteína final) e tratadas com tampão *Laemmli* (azul de bromofenol, Na₂HPO₄, SDS, glicerol, e DTT), sendo armazenadas a -80 °C.

Para realização da separação da proteína total em bandas de peso molecular definidos, em cada amostra foi aplicado gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), e submetida à eletroforese. Após serem separadas, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45 µm de diâmetro, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) utilizando o sistema de transferência semi-seco (*semi-dry*; Trans-Blot® SD Semi-Dry

Transfer Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Depois das proteínas serem transferidas, as membranas foram submetidas à solução de bloqueio contendo 5% de leite desnatado em salina tamponada, com Tween 20 (TTBS; 0,01 M de Tris-HCI; pH 7,4; 0,15 M de NaCI; 0,05% de Tween 20), pelo período de duas horas. Depois de lavadas em tampão TTBS (3 x 10 minutos), as membranas foram incubadas em solução contendo anticorpos primários contra as proteínas avaliadas por 12-36 horas (4 °C), em TTBS contendo 5% de albumina e azida de sódio (0,01g/ml). Após três lavagens (10 minutos cada) em TTBS, as membranas foram incubadas em uma solução com anticorpo secundário, marcado com peroxidase, TTBS e leite 1%, por duas horas (25 °C). A revelação foi realizada pela exposição das membranas a solução proveniente do kit ECL (1:1, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA EUA), sendo a fluorescência captada por meio de transiluminador (CB4 1QB-UK, UVITEC CambriDGe, Cambridge, England, UK). As imagens respectivas as bandas com peso molecular aproximado da proteína de interesse, marcadas pela seguência de incubação dos anticorpos, foram submetidas à avaliação de densitometria utilizando o programa ImageJ (National Institute of Mental Health, EUA). Os valores obtidos da densidade óptica foram normalizados pela razão do valor da densidade óptica dada pela proteína β-actina, (controle interno), respectivo a cada amostra. Os valores foram normalizados pela média da densidade óptica de animais P60 de cada membrana.

Anticorpos Primários	Concentração	Empresa	N° de Catálogo
Anti-Cx36 Rb	1:1000	Zymed/ Invitrogen	36-4600
Anti-Cx45 Rb	1:1000	EDM Millipore	AB 1745
Anti-β-actina Ms	1:10000	Sigma-Aldrich	A5316
Anticorpos Secundários	Concentração	Empresa	N° de Catálogo
Anti-Rb HRP	1:5000	GE Helthcare- Amersham	NA934
Anti-Ms HRP	1:5000	GE Helthcare- Amersham	NA931

Tabela 2. Anticorpos (primários e secundários) utilizados para análise de densidade ótica obtida através da técnica de *Western Blot*.

3.7 Caracterização do padrão de distribuição proteica por imuno-histoquímica

Para avaliar o perfil de localização da Cx36 e Cx45 durante o desenvolvimento pós-natal, utilizamos animais P0, P5 e P10. Os encéfalos emblocados foram submetidos a cortes coronais (12 µm de espessura) com auxílio de criostato (Leica CM1850, Leica Mikrosysteme Vertrieb, Wetzlar, Germany). As fatias de encéfalo contendo o hipocampo foram diretamente coletadas em lâminas de vidro gelatinizadas. Depois de lavados em tampão fosfato (PB 0,1 M; 2x 5 minutos), os cortes foram incubados em solução de bloqueio (3% de NDS, normal donkey serum, ou NGS, normal goat serum, PBS 0,1 M, 0,5%Triton X-100) por 1 hora (temperatura ambiente - ~25 °C). Depois de novamente lavadas, as lâminas foram incubadas com solução contendo os anticorpos primários diluídos (concentração de 1:200 ou 1:300) em 0,5% Triton X-100 em PB 0,1M, junto ao respectivo soro do animal no qual foi feito o anticorpo secundário (5% NDS ou NGS), pelo período de 12-20 horas em temperatura ambiente. Depois de lavadas (2 lavagens de 5 minutos em PB 0,1 M), os cortes foram incubados em solução contendo anticorpos secundários conjugados com Alexa488 ou Alexa546, contra as IgG das espécies onde os anticorpos primários foram produzidos junto ao DAPI (4',6-diamidino-2fenilindole, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) (Solução de anticorpo secundário: 1:500 de anticorpo secundário, PB 0,1 M com 0,5% Triton X-100 e

DAPI) por duas horas em temperatura ambiente. Depois de lavadas (2 lavagens de 5 minutos em PB 0,1 M), as lâminas foram secadas e expostas a solução de glicerol carbonato antes de serem fechadas com lamínulas, vidro e esmalte. O controle dos experimentos de imuno-histoquímica foi realizado com a omissão dos anticorpos primários em cada experimento realizado. A especificidade dos anticorpos utilizados foi validada anteriormente em tecidos de animais KO, ou por eliminação de marcação por peptídeos (Kihara et al., 2006b) Em todos os casos, não obtivemos imunomarcação. Para obtenção das fotos referentes às regiões hipocampais, utilizamos o microscópio de fluorescência (Leica Mikrosysteme Vertrieb, Wetzlar, Germany). As figuras foram montadas utilizando Adobe Photoshop CS5. O tratamento das imagens foi restrito a regulação dos níveis de brilho e contraste de cada imagem.

Anticorpos Primários	Concentração	Empresa	N° de Catálogo
Anti-Cx36 Rb	1:300	Zymed/ Invitrogen	36-4600
Anti-Cx45 Rb	1:300	EDM Millipore	AB 1745
Anti-GFAP Ms	1:300	Sigma-Aldrich	A5316
Anti-CamKIIα Ms	1:300	Abcam	ab22609
Anticorpos Secundários	Concentração	Empresa	N° de Catálogo
Alexa Fluor 488 DK- Anti-Rb	1:500	Zymed/ Invitrogen	A21206
Alexa Fluor 546 DK- Anti-Ms	1:500	Zymed/ Invitrogen	A10036

Tabela 3. Anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de imuno-histoquímica.

A quantificação das imagens de imuno-histoquímica foi realizada a partir da utilização do programa ImageJ (*National Institute of Mental Health*, EUA). As quantificações foram feitas de acordo com Kihara et al. (2008) e Kinjo et al. (2013). Por meio da separação dos canais de cores (RGB) das imagens, definimos as áreas de interesse (ADI) na imagem respectiva ao DAPI (canal azul). Depois de estabelecida a ADI, essa seleção foi transferida para o mesmo local na imagem segregada respectiva ao canal da proteína de interesse (ex. verde), onde foi efetuada a quantificação da intensidade média de pixel da ADI. Os valores obtidos de cada área de interesse, pertinentes a uma região contida em uma fatia de hipocampo, foram agrupados para calcular a mediana da intensidade média de pixel de cada sub-região. Para obter a porcentagem de imunomarcação referente a cada sub-região dos valores das medianas de cada sub-região, pela soma de todas medianas das sub-regiões que compõe a região de interesse (valor 100%= valor da região principal). Para estabelecer o valor de distribuição da imunomarcação referente a cada período do desenvolvimento do hipocampo, utilizamos de três a quatro animais (n= 4) para cada período analisado.

Já para realização das análises de dupla marcação utilizamos o coeficiente de Manders. Para isso, as imagens de hipocampo de animais P0 foram submetidas à separação de canais, definindo a área do hipocampo pelo canal de DAPI. Sendo definida a ADI, esta foi transferida para ambos os canais respectivos a cada proteína marcada. Utilizando o programa ImageJ, foram obtidos valores respectivos ao coeficiente M1 e M2. O mesmo procedimento foi realizado para 3-4 cortes de hipocampo de cada animal. Por sua vez, para determinar o valor de colocalização respectiva a um grupo amostral (P0), realizamos o mesmo procedimento para quatro animais distintos (n= 4).

3.8 Preparação de drogas para utilização em registros eletrofisiológicos in vitro

Para avaliar o papel das JCs sobre a atividade hipocampal *in vitro*, utilizamos os compostos carbenoxolona (CBX, Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, EUA) e mefloquina (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, EUA) para indução do bloqueio das JCs de forma abrangente e JCs formadas por Cx36, respectivamente (Cruikshank et al., 2004, Juszczak; Swiergiel, 2009). Para isso foram produzidas soluções estoques com concentração de 100 mM para ambas as drogas. Para isso, CBX foi diluído em água deionizada e mefloquina diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, SigmaAldrich Corporation, Saint Louis, MO, EUA). Ambos os compostos foram diluídos para concentração de 50 µM em aCSF para serem usados para perfusão das fatias de hipocampo registradas.

Além disso, foram utilizadas 1 µM de tetrodotoxina (TTX) em alguns registros para excluir a possibilidade dos eventos registrados serem provenientes de ruído. Para isso, solução estoque contendo 10 mM de TTX foram feitas por meio da diluição das drogas em DMSO.

3.9 Preparação de fatias de hipocampo para avaliação eletrofisiológica em MEA

Para avaliação eletrofisiológica foram utilizados animais entre 0 e 10 dias de idade (P0-3, P8-10). Logo após, os encéfalos foram rapidamente removidos e submersos em solução de corte composto de (em mM) sacarose 75; NaCl 87; NaHCO₃ 25; KCl 2,5; NaH2PO₄ 1,25; CaCl₂ 0,5; MgCl₂ 7; Dglicose 25 perfundido com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), mantido a 4° C. Após a remoção do cerebelo, os hemisférios encéfalicos foram separados com um corte sagital único. Parte do neocórtex foi removido e ambos os hemisférios foram aderidos a plataforma do vibrátomo com auxílio de cola cinoacrilato. Após fixado na câmara do vibrátomo contendo solução de corte (perfundido com carbogênio, 4° C), os hemisférios foram seccionados transversalmente com auxílio de vibrátomo (0,07 mm/seg, 0,9 mm de amplitude, VT-12005, Leica Mikrosysteme Vertrieb, Wetzlar, Germany) resultando em fatias de 400 µm de espessura (Bischofberger et al., 2006, Hill et al., 2010). As fatias de encéfalos foram coletadas e condicionadas em solução artificial cérebro-espinhal (aCSF) composto de (em mM) 126 de NaCl, 26 NaHCO3; 2,5 KCl; 1,25 NaH₂PO4; CaCl₂; 2 MgCl₂.6H₂0; 10 D-glicose, perfundida continuamente com carbogênio e mantidas a 30 °C por 30 min. Antes de serem efetuados os registros eletrofisiológicos, as fatias de encéfalo foram mantidas por 2-3 horas em temperatura ambiente (~25 °C).

3.10 Avaliação eletrofisiológica em MEA

O registro de atividade elétrica extracelular das fatias de encéfalo contendo hipocampo foi realizado utilizando matriz de 60 eletrodos com

eletrodo de referência embutido. O eletrodo possuía 30 µm de diâmetro, e o espaçamento entre eletrodos era de 200 µm. O raio da área de registro era de 100 µm (Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Germany). Antes dos registros serem efetuados, as MEAs foram submetidos a esterilização por meio da aplicação de detergente Terg-A-Zyme (Cole-Parmer North America, Vernon Hills, IL, EUA), água deionizada e metanol 100%. Após secarem, as MEAs foram submetidos a limpeza com plasma (Plasma cleaner, PDC-32-2 - Harrick Plasma, Ithaca, NY, EUA) 10-30 minutos antes de ser iniciado os registros. Este procedimento permite a eliminação de impurezas por meio da ionização de gases pressurizados, assim como, a redução da hidrofobicidade da superfície das MEAs. Sendo assim, este método possibilita uma melhor adesão das fatias de encéfalo, favorecendo a aquisição do sinal registrado. As fatias foram alocadas em MEAs por meio da observação realizada em microscópio invertido (Nikon TS-51, Sendai Nikon Corporation, Natori, Miyagi, Japão) e a posição foi mantida através da utilização de harpas (harps) caseiras ou específicas para MEA (Scientifica, Brambleside, Uckfield, UK). As imagens das fatias sobre os eletrodos foram capturadas via câmera Micro-Okular (Meade Instruments Corp, Irvine, CA EUA) e usadas para identificar as áreas registradas. As fatias mantidas nas MEAs foram posicionadas no headstage (Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Germany), acopladas a um sistema de perfusão contínuo (2 ml/min aCSF perfundida com carbogênio, 32 °C) e mantidas por 10 minutos para estabilização do tecido.

Com o intuito de avaliar a proximidade de áreas hipocampais específicas em relação ao eletrodo, assim como a viabilidade da fatia, 5 pulsos de estímulos elétricos consecutivos (160 µs pulso bifásico com amplitude de ±1-2 V, intervalo de 10 segundos, Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Germany) foram aplicados em áreas específicas a fim de estimular sistemas de fibras distintas (sistema de fibras musgosas, colateral de Shaffer) do hipocampo (Domenici et al., 1998, Scullin et al., 2010, Rombo et al., 2015). Após verificada a viabilidade e proximidade do tecido e os níveis de atividade retomarem a normalidade, registros contínuos foram efetuados com frequência de amostragem de 10 kHz por canal. O sinal captado foi simultaneamente amplificado (1200× ganho) por meio de amplificador com capacidade de 120 canais (MEA60 System, Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Germany). A aquisição foi controlada e processada usando o software MC Rack (Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Germany). Para acessar o efeito do bloqueio das JCs (mefloquina e CBX - Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, EUA) sobre a atividade hipocampal, as fatias foram registradas por 10 minutos em solução de aCSF, visando a obtenção do registro de atividade espontânea basal. Em seguida, 20-30 minutos de registro foram efetuados sobre fatias expostas a aCSF contendo bloqueadores de JCs (mefloquina ou CBX; 50 μ M). Em algumas fatias de hipocampo, registros adicionais com aCSF contendo 1 μ M de TTX foram realizados para verificação de possíveis artefatos provenientes de ruídos na atividade registrada. Dados provenientes dos registros das fatias de hipocampo foram gravados para posterior processamento e quantificação *offline*.



Figura 8- Procedimento para preparação e registros de fatias de hipocampo em MEAs. (1) Após o encéfalo ser removido e preparado, ambos os hemisférios hipocampais foram submetidos a cortes transversais (400 µm de espessura) em vibrátomo. (2) Fatias de encéfalos contendo a região hipocampal foram incubadas por 30 minutos em solução de aCSF, continuamente gaseificado com carbogênio a 30 °C (3) e 2-3 horas em temperatura ambiente (~25 °C). (4) As fatias de encéfalo foram posicionadas em MEA através da visualização em microscópio invertido (amplificação de 4x) para assegurar o posicionamento correto da região hipocampal sobre os eletrodos. (5) Após fixados no *headstage*, as fatias de hipocampo foram mantidas perfundidas com aCSF (2

ml/min, carbogenizada, 32 °C) por 10 minutos para acomodação e estabilização do tecido. (5a) Pulsos bifásicos de estimulações elétricas foram aplicadas em regiões hipocampais específicas visando avaliar a viabilidade do tecido e posicionamento dos eletrodos. (5b) Registros contínuos foram obtidos por 10 minutos para registro da atividade espontânea basal do hipocampo. (5c) Logo após, as fatias foram submetidas a perfusão de aCSF contendo bloqueadores de JCs (CBX ou mefloquina, 50 µm) e registradas por 20-30 minutos.

3.11 Análise dos registros eletrofisiológicos em MEA

Dados provenientes dos registros contínuos utilizando MEA foram processados com auxílio do software MC Rack. Antes da aplicação das análises, dados provenientes dos registros de MEA foram submetidos à filtragem de ruídos contidos na faixa de frequência de 50 Hz (Bandstop Resonator f =50 Hz Q=2.0), assim como a filtragem de componentes de baixa frequência por meio da aplicação de um filtro passa-alta com frequência de corte ajustado para 200 Hz (filtro Butterworth 2nd order). Para acessar as possíveis alterações sobre a excitabilidade das fatias do tecido submetidas ao bloqueio de JCs, foram extraídos dados referentes a frequência de potenciais de ação por meio da aplicação de spike sorter ajustado para -6 do desvio padrão do ruído de base de cada eletrodo (MC Rack, Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Germany). Para realização das análises, foram quantificadas apenas atividades de eletrodos posicionados sob o hipocampo. Tabelas contendo informações da frequência de potenciais de ação foram extraídas de cada registro (10 minutos atividade basal, 10 minutos atividade sob efeito de bloqueadores de JCs, bin= 1 seg) e submetidas a análise de frequência média de potenciais de ação, identificação e análise dos eletrodos mais ativos, quantidade de eletrodos ativos e quantidade relativa de disparos de potenciais de ação com frequência superior ou igual a 23Hz, com auxílio do software Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Syracuse, NY, EUA). Informações relativas ao registro obtidos de uma mesma fatia de hipocampo (registro basal versus registro sob efeito dos bloqueadores) foram normalizadas de acordo com os valores do registro basal.

3.12 Análise estatística

As análises provenientes dos registros eletrofisiológicos foram submetidas a teste T de *Student* pareado com valor de significância igual ou

menor a 5% para comparação entre atividade basal e atividade após a indução do bloqueio das JCs. Análises estatísticas foram realizadas sobre os dados referentes a avaliação da expressão gênica (PCR em tempo real), avaliação dos níveis proteicos (*Western Blot*) e das análises referentes à técnica de imuno-histoquímica através do uso da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do pós-teste Tukey com valor de significância igual ou menor a 5%. As análises, sempre que possível, foram efetuadas em teste cego com examinadores isentos. Além disso, resultados obtidos através de métodos histológicos foram considerados representativos e reprodutíveis em pelo menos três experimentos independentes e de três animais distintos.

4 RESULTADOS





Figura 9- Análise da expressão gênica da Cx36 e Cx45 durante o desenvolvimento do hipocampo de ratos. (A) Curvas de amplificação obtidas com o uso de amostras de hipocampo coletadas em P0 (vermelho) e P60 (verde) utilizando primers para Cx36. Amostras de P0 e P60 apresentam curvas de amplificação semelhantes. (B) Curvas de amplificação referente às amostras de hipocampo obtidas em P0 (vermelho) e P60 (verde) utilizando primers para Cx45. Amostras de hipocampo de animais P0 necessitam de menos ciclos para poderem ser visualizados em relação às amostras de animais P60. (C) Curvas de amplificação de amostras de hipocampo obtidas em P0 (vermelho) e P60 (verde) utilizando primers para GAPDH. Amostras de animais P0 e P60 necessitam de quantidades de ciclos semelhantes para se tornarem visíveis. (D) Nota-se que as amostras de hipocampo P5 e P10 apresentam níveis maiores de transcritos de Cx36 em relação a P60. (E) Os transcritos da Cx45 apresentam níveis mais elevados nas amostras obtidas nas primeiras semanas de vida (P0, P5 e P10) em relação às amostras de hipocampo P60. (F) Barras referentes à média de ciclos obtida através de análise do controle interno GAPDH nas diferentes amostras de hipocampo. Barras representam erro padrão da média. n= 6-9. *P<0,01, **P<0,001 vs. P60, ANOVA de uma via, seguido de pós-teste Tukey.

A partir de experimentos de PCR em tempo real, avaliamos a presença de transcritos das Cx36 e Cx45, assim como o perfil de expressão gênica durante o desenvolvimento pós-natal de ratos. Por meio da utilização de *primers* desenhados para Cx36, evidenciamos a presença dos transcritos desse gene no hipocampo, em todos os períodos analisados. No dia do nascimento (P0), os níveis de RNAm encontrados no hipocampo foram similares aos observados no hipocampo de animais adultos (2^0,5 9± 0,38 = 1,51vezes P60; *P*>0,05) (Figura 9). Porém, ao decorrer da primeira (P5: 2^3,89 ± 0,29 vezes a expressão de P60; **P*<0,001) e da segunda semana (P10: 3,27

± 0,37 vezes a expressão de P60;**P*<0,01) do desenvolvimento pós-natal, os níveis de transcritos da Cx36 foram superiores aos níveis registrados no hipocampo adulto (Figura 9).

Assim como a Cx36, os transcritos da Cx45 foram detectados no hipocampo em todos os períodos estudados. Os resultados de expressão gênica da Cx45 apontaram que logo após o nascimento (P0: $2^2,74 = 6,70 \pm 0,098$ vezes P60; **P*<0,001), assim como na primeira (P5: $2^2,73 = 6,63 \pm 0,17$ vezes P60; **P*<0,001) e segunda semana (P10: $2^2,25 = 4,75 \pm 0,15$ vezes P60; **P*<0,001) de vida do animal, o hipocampo apresenta alta concentração de RNAm da Cx45, em relação ao hipocampo adulto (Figura 9).

Para realização desses experimentos utilizamos o GAPDH como controle interno. Como esperado, os níveis dos transcritos desse gene de referência apresentaram valores semelhantes nas amostras de hipocampo, nos diferentes períodos avaliados.





Figura 10- Análise dos níveis proteicos da Cx36 e Cx45 durante o desenvolvimento do hipocampo de ratos. (A) Bandas referentes à Cx36 (36 kDa), Cx45 (45 kDa) e β-actina (42 kDa) obtidas por meio da técnica de *western blot* em amostras de hipocampo, obtidas em diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal (P0-P10) e em adulto (P60). Valores adjacentes às bandas da Cx36 (38 kDa e 24 kDa) e Cx45 (52 kDa e 38 kDa) representam os valores respectivos as bandas da proteína padrão. A proteína β-actina foi utilizada como controle interno. A densidade óptica das bandas (DOB), referente às amostras de hipocampo P0, P5 e P10, foi comparada com os valores de DOB de amostras P60 em três experimentos independes (*n*=6). (B) Nossos resultados apontam que durante o desenvolvimento pós-natal os níveis de Cx36 são baixos em comparação com adulto. (C) Os níveis proteicos de Cx45 em P0 não apresentam diferenças significativas em relação ao hipocampo adulto. Porém, em P5 e P10, os níveis dessa proteína encontram-se reduzidos em relação ao hipocampo adulto. Barras representam o erro padrão da média. **P*<0,01, **P*<0,001 vs. P60. ANOVA de uma via, seguido de pós-teste Tukey.

Depois de identificado a presença dos transcritos das Cx36 e Cx45 durante diferentes idades do hipocampo, aplicamos a técnica de *western blot* para avaliar a capacidade dos transcritos de serem traduzidos em proteínas. Nossos resultados mostraram a presença da Cx36 em diferentes idades avaliadas (Figura 9A). O perfil dos níveis proteicos da Cx36 demonstrou que essa proteína está reduzida em P0 (8,63%, \pm 3,5; **P*<0,001), P5 (15,49%, \pm 7,2; **P*<0,001) e P10 (10,23%, \pm 1,3; **P*<0,001), em relação ao hipocampo adulto (Figura 10).

Do mesmo modo, foi possível identificar a presença da Cx45 no hipocampo nos diferentes períodos analisados (Figura 10A). A avaliação do perfil de concentração da Cx45 nos permitiu observar que os níveis proteicos da Cx45 apresentaram valores semelhantes entre o hipocampo de animais neonatos (P0: 73 \pm 7,5%; *P*>0,05) e adultos (P60). Porém, durante a primeira (P5: 55 \pm 7,6%; **P*<0,01) e segunda semana do desenvolvimento pós-natal (P10: 60 \pm 8,9%; **P*<0,01), os níveis de Cx45 foram encontrados reduzidos em relação ao hipocampo adulto (Figura 10C).

4.3 Cx36 e Cx45 estão presentes nas principais regiões que compõe o hipocampo durante o período do desenvolvimento pós-natal de ratos

Por meio da aplicação do método de imuno-histoquímica investigamos o padrão de distribuição da Cx36 e da Cx45 em CA1, CA3 e GD, em função dos diferentes períodos pós-natal estudados. O padrão de marcação puntiforme referente à Cx36 e Cx45, manifestou-se nas três regiões analisadas (Figura 11 e 12 A-S). No período referente ao nascimento (P0: CA1 = 21,61 ± 1,41%; CA3 = 38,45 ± 4,5%; GD = 34,95 ± 5,9%), assim como na primeira semana do desenvolvimento pós-natal (P5: CA1 = 28,18 ± 1,67%; CA3 = 34,78 ± 2,78%; GD = 35,49 ± 1,25%), não foi detectado acúmulo preferencial da Cx36 em nenhuma das três regiões estudadas. De forma similar, a Cx45 não apresentou acúmulo diferenciado entre CA1, CA3 e GD em P0 (CA1 = 26,60 ± 1,4%; CA3 = 38,45 ± 4,53%; GD = 34,95 ± 5,90%) e em P5 (CA1 = 34,42 ± 3,1%; CA3 = 32,01 ± 1,1%; GD = 31,88 ± 2,34%) (Figura 12). Porém, no hipocampo de animais P10, foi observado diferentes níveis de Cx36 nas três regiões avaliadas (Figura 11T-U). As análises indicaram que o GD (38,96 ±0,86%, **P<0,01 vs.CA1; *P<0,05 vs.CA3) apresentou uma maior concentração de

Cx36 em relação à CA1 (28,75 ± 0,51%; **P<0,01 vs. GD; *P<0,05 vs. CA3) e CA3 (33,56 ± 1,23%; *P<0,05 vs.CA3; *P<0,05 vs. GD), respectivamente (CA1<CA3<GD) (Figura 11V). Assim como a Cx36, a Cx45 demonstrou estar mais concentrada em GD (38,41 ± 0,9%; *P<0,05 vs. CA3; *P<0,05 vs. CA1) em relação à CA1 (29,81 ± 2%; *P<0,05 vs. GD) e CA3 (31,78 ± 1,1%; *P<0,05 vs. GD) (Figura 12).



Figura 11- Padrão de distribuição da Cx36 em diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos. (A) Marcação da Cx36 (verde) obtida através da técnica de imuno-histoquímica em fatia de hipocampo P0, contracoradas com DAPI (azul) (barra de escala=100 μm). (B-D) Imunolocalização da Cx36 (verde) na região de CA1 (B), CA3 (C) e GD (D) do hipocampo de ratos P0. (E-G) Imunolocalização da Cx36 (verde) na região CA1 (E), CA3 (F) e GD(G) de ratos P0, contracoradas com DAPI (azul). Nota-se que durante esse período, a distribuição da Cx36 apresentou níveis similares em todas as regiões analisadas. (H-J) Imunomarcação da Cx36 (verde) na região de CA1 (H), CA3 (I) e GD (J) do hipocampo de ratos P5. (K-M) Localização da Cx36 (verde) através de imuno-histoquímica na região de CA1 (K), CA3 (L) e GD (M) do hipocampo de ratos P5, contracoradas com DAPI (azul). Assim como em P0, a Cx36 estava distribuída de forma homogênea em diferentes regiões analisadas do hipocampo P5. (N-P) Imunomarcação da Cx36 (verde) na região de CX36 (verde) na região de CX36 (verde) na região de CX36 (verde) de ratos P5, contracoradas com DAPI (azul). Assim como em P0, a Cx36 estava distribuída de forma homogênea em diferentes regiões analisadas do hipocampo P5. (N-P) Imunomarcação da Cx36 (verde) na região de CA1 (N), CA3 (O) e

GD (P) do hipocampo de ratos P10. (Q-S) Imunomarcação da Cx36 (verde) na região de CA1 (N), CA3 (O) e GD (P) do hipocampo de ratos P10, contracorados com DAPI (azul). Barra de escala: 25 µm. (T) Porcentagem da intensidade de marcação avaliada na região CA1, CA3 e GD de ratos. Nossas análises evidenciaram que a distribuição da Cx36 ocorre de forma homogênea no hipocampo de animais P0. (U) Nas análises de imagens realizadas em P5, observamos um padrão de distribuição homogêneo, similar a P0. (V) A avaliação da distribuição de Cx36 em P10 demonstrou que a Cx36 apresenta-se mais concentrada no GD e menos presente em CA1 (GD>CA3>CA1). Barras representam o erro padrão da média. *P<0,05; **P<0,001 em ANOVA de uma via, seguido de pós-teste Tukey.

A partir das observações iniciais, referentes ao padrão de distribuição das Cxs neuronais em CA1, CA3 e GD, foi possível notar perfis de distribuição distintos em cada região do hipocampo. Sendo assim, decidimos avaliar o padrão de distribuição da Cx36 e Cx45 em diferentes camadas da região CA1, CA3 e GD.



Figura 12- Padrão de distribuição da Cx45 em diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos. (A) Marcação da Cx45 (verde)

obtida através da técnica de imuno-histoquímica em fatia de hipocampo P0, contracoradas com DAPI (azul) (barra de escala= 100 µm). (B-D) Imunolocalização da Cx45 (verde) na região de CA1 (B), CA3 (C) e GD (D) do hipocampo de ratos P0. (E-G) imunolocalização da Cx45 (verde) na região CA1 (E), CA3 (F) e GD(G) de ratos P0, contracoradas com DAPI (azul). Durante esse período, a distribuição da Cx45 encontra-se concentrada de forma homogênea nas três regiões analisadas. (H-J) Imunomarcação da Cx45 (verde) na região de CA1 (H), CA3 (I) e GD (J) do hipocampo de ratos P5. (K-M) Localização da Cx45 (verde) através de imuno-histoquímica na região de CA1 (K), CA3 (L) e GD (M) do hipocampo de ratos P5, contracoradas com DAPI (azul). Em P5, a Cx45 encontra-se distribuída de forma similar nas regiões analisadas do hipocampo. (N-P) Imunomarcação da Cx45 (verde) na região de CA1 (N), CA3 (O) e GD (P) do hipocampo de ratos P10. (Q-S) Imunomarcação da Cx45 (verde) na região de CA1 (N), CA3 (O) e GD (P) do hipocampo de ratos P10, contracoradas com DAPI (azul). Barra de escala: 25 µm. (T) Porcentagem da intensidade de marcação avaliada na região CA1, CA3 e GD de ratos P0. Nossas análises evidenciaram que a distribuição da Cx45 ocorre de forma homogênea no hipocampo de animais P0. (U) Nas análises de imagens realizadas em P5, observamos um padrão de distribuição homogêneo, similar a P0. (V) A avaliação da distribuição de Cx45 em P10, mostra que a Cx45 apresenta-se mais concentrada no GD em relação a CA1 e CA3. Barras representam o erro padrão da média. *P<0.05 ANOVA de uma via, seguido de pós-teste Tukey.

4.4 Distribuição da Cx36 e Cx45 nas camadas de CA1, em função do período do desenvolvimento pós-natal



Figura 13- Distribuição da Cx36 nas camadas de CA1, nos diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal. (A) Imunolocalização da Cx36 (verde) na região CA1 de fatias de hipocampo de ratos P0, contracoradas com DAPI (azul). (B-C) Área amplificada da camada SPy de CA1 do hipocampo de animais P0. Nesta região é possível observar o adensamento da imunomarcação de Cx36, assim como a presença de grandes pontos, possivelmente gerado pelo agrupamento de Cx36 (setas). (D-E) Área

amplificada da camada SR de CA1 do hipocampo de animais P0. Observamos uma menor concentração da imunomarcação de Cx36 em SR, em relação à SPy, sendo a marcação caracterizada por pontos pequenos (cabeça de seta). (F) Análise de distribuição da Cx36 nas diferentes camadas de CA1 de P0. Nota-se que a Cx36, em P0, ocorre predominantemente no SPy de CA1. (G) Imunolocalização da Cx36 (verde) na região CA1 de hipocampo de ratos P5, contracoradas com DAPI (azul). (H-I) Área amplificada da camada SPy de CA1 do hipocampo de P5. Assim como P0, o SPy de P5, há uma grande concentração da imunomarcação de Cx36 com presença de pontos adensados (setas brancas). (D-E) Área amplificada da camada SR de CA1 do hipocampo de animais P5. Assim como P0, é possível observar uma menor concentração da imunomarcação de Cx36 em SR em relação à SPy, sendo a marcação caracterizada por pequenos pontos. Aparentemente, a marcação da Cx36 nessa região (SR) está mais presente em relação à mesma camada em P0. (L) Análise de distribuição da Cx36 nas diferentes camadas de CA1 de P5. Nossas análises revelaram que a Cx36 está mais presente em SPy, em relação às outras camadas de CA1. (M) Imunomarcação da Cx36 (verde) na região CA1 de hipocampo de ratos P10, contracoradas com DAPI (azul). (N-O) Apesar da imunomarcação da Cx36 encontrar-se concentrada nesta camada, o padrão de imunomarcação ocorre de modo diferente em relação a P0 e P5, sendo caracterizado por pontos menores (setas brancas). (P-Q) Área amplificada da camada SR de CA1 do hipocampo de animais P10. Apesar da imunomarcação da Cx36 ser menos densa que SPy, a concentração de Cx36 se apresenta mais concentrada no SR de P10 em relação a mesma camada de P0 e P5, sendo a marcação pontos menores (cabeça de seta). (R) Análise de distribuição da Cx36 nas diferentes camadas de CA1 de animais P10. Nossas análises demonstram que a Cx36 encontra-se mais presente em SPy, em relação às outras camadas de CA, assim como, SO e SR apresentam mais Cx36 que SLM. SO-Stratum oriens; SPy- stratum pyramidale; SR- stratum radiatum; SLM- stratum lacunosummoleculare. Barras representam o erro padrão da média. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 em Anova de uma via seguido de pós-teste Tukey. Barras de escala: 50 µm.

Na região CA1 de animais P0, observamos a imunolocalização de Cx36 em todas as camadas dessa região. Os níveis de Cx36 apresentaram-se majoritariamente elevados na camada de células principais (SO=18,90 ±1,81%; SPy = 49,87 ± 7,59%; SR = 14,95 ± 0,37%; SLM = 16,28 ± 2,84%; **P*<0,001 vs. SPy) em comparação com as demais camadas de CA1 (Figura 13A-F). Na primeira semana do desenvolvimento pós-natal (P5), o perfil de distribuição ocorreu de forma similar a P0, apresentando elevados níveis de imunorreatividade em SPy (SO=8,16 ± 1,28%; SPy=44,86 ± 5,77%; SR=17,05 ± 1,29%; SLM=12,61 ± 2,63%, **P*<0,01 vs SPy) (Figura 13G-L). Na segunda semana do desenvolvimento pós-natal, a distribuição da Cx36 se revelou alterada em relação às idades anteriores analisadas. Apesar da Cx36 ainda ocorrer de forma predominante em SPy (35,98 ± 0,42%; **P*<0,001 vs SR, SO, SLM), sua presença em outras camadas de CA1 se torna mais constante (SO = 21,99 ± 0,26 *P*<0.05 vs. SLM ; SR = 22,00 ± 0,36%; SLM = 20 ± 0,43%).

Além de apresentar padrões distintos de distribuição em função do desenvolvimento, a Cx36 exibe aspecto de imunomarcação distinto em função

do período analisados. A imunomarcação é caracterizada por pontos maiores que ocorrem principalmente na camada SPy durante o início do desenvolvimento pós-natal (P0 e P5). Em P10, a imunomarcação é caracterizada por um aspecto puntiforme com tamanho relativamente uniforme (Figura 13).



Figura 14- Distribuição da Cx45 nas camadas de CA1, nos diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal. (A) Imunomarcação de Cx45 (verde) na região CA1 de hipocampo de ratos P0, contracoradas com DAPI (azul). (B-C) Área amplificada da camada SPy de CA1 do hipocampo de animais P0. Nesta região é possível observar o adensamento da imunomarcação de Cx45 em áreas perinucleares (setas brancas). (D-E) Área amplificada da camada SR de CA1 do hipocampo de animais P0. É possível observar uma menor concentração da imunomarcação de Cx45 nessa região. sendo a marcação caracterizada por pontos esparsos. (F) Análise de distribuição da Cx45 em diferentes camadas de CA1 de P0. Nossas análises mostraram que a marcação Cx45 encontra-se predominantemente presente em SPy e SLM de CA1. (G) Imunolocalização da Cx45 (verde) na região CA1 de hipocampo de ratos P5, contracoradas com DAPI (azul). (H-I) Área amplificada da camada SPy de CA1 do hipocampo de animais P5. Em SPy de P5, o padrão de marcação acontece de forma semelhante a P0 (setas brancas). (D-E) Área amplificada da camada SR de CA1 do hipocampo de animais P5. Assim como P0, os níveis de imunorreatividade para Cx45 foram menores nessa camada em relação à SPv. sendo a marcação caracterizada por pontos dispersos . (L) Análise de distribuição da Cx45 em diferentes camadas de CA1 de P5. Nossas análises evidenciaram um padrão de distribuição similar ao observado em P0. (M) Imunomarcação da Cx45 (verde) na região CA1 de hipocampo de ratos P10, contracoradas com DAPI (azul). (N-O) Durante esse período do desenvolvimento, observamos um padrão de marcação similar às idades anteriores, sendo caracterizada por um adensamento próximo ao núcleo (setas brancas). (P-Q) Área amplificada da camada SR de CA1 do hipocampo de animais P10. Assim como observado em SPy, os níveis de marcação da Cx45 em SR ocorrem de forma similar nas diferentes idades do desenvolvimento estudadas (R) Análise de distribuição da Cx45 nas camadas de CA1 de animais P10. Nossas análises demonstram que a Cx45 ocorre concentrada predominantemente em SPy em relação às outras camadas de CA1. SOstratum oriens; SPy- stratum pyramidale; SR- stratum radiatum; SLM- stratum lacunosummoleculare. Barras representam o erro padrão da média. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 em Anova de uma via seguido de pós-teste Tukey. Barras de escala: 50 µm.

Assim como a Cx36, nossos experimentos de imuno-histoquímica indicaram a presença de Cx45 em todas as camadas de CA1, nos distintos períodos do desenvolvimento pós-natal (Figura 14). Logo após o nascimento (P0), a Cx45 encontra-se preferencialmente localizada em SPy (48,40 ± 1,18%; **P*<0,001 vs. SO, SR e SLM) e SLM (27,21 ± 1,7%; **P*<0,05 vs. SO, SPy e SR), respectivamente (SO=10,09 ± 1,6%; SR=14,3 ± 0,26) (Figura 14A-F). Durante a primeira semana do desenvolvimento pós-natal (P5), observamos o mesmo padrão de imunolocalização da Cx45, em comparação com o perfil observado em P0 (SO=16,26 ± 0,4%; SPy=41,5 ± 0,54%; SR=15,66 ± 0,21%; SLM=26,62 ± 0,74%) (Figura 14). Em P10, a proporção dos níveis de imunomarcação para Cx45 demonstrou-se alterada, apesar de ocorrer mais presentes em SPy (40,55 ± 2,37%; **P*<0,01 vs. SO, SR e SLM), em relação às outras camadas de CA1 (SO=16,74 ± 0,14; SR=15,25 ± 0,81%; SLM=21,11 ± 1,43%) (Figura 14).

A partir das observações desse experimento, notamos que a imunomarcação da Cx45 apresentou-se como pequenos pontos próximos entre si, muitas vezes localizados junto ao núcleo celular (setas na Figura 14). Sendo assim, a Cx45, possivelmente, encontra-se majoritariamente situada na região somática ou adjacente a essa, nas células que a expressam.

4.5 Distribuição de Cxs neuronais nas camadas de CA3, em diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal

A partir das análises da imunolocalização da Cx36 na região CA3, evidenciamos a presença da Cx36 em todas as camadas que constituem tal região, independente do período do desenvolvimento pós-natal analisado. Em P0, a imunomarcação da Cx36 ocorre de forma predominante em SPy (SO=11,20 \pm 1,44%, SPy=36,79 \pm 5,06%, SL=19,74 \pm 0,37%, SR=17,53 \pm 1,96%, SLM=14,74 \pm 6,16%, **P*<0.0001 SPy vs. SO, SL, SR, e SLM), em comparação com outras camadas de CA3 (Figura 15). Em P5, a

imunomarcação para Cx36 apresentou poucas alterações referentes ao padrão de distribuição, sendo SPy ($35,73 \pm 4,74\%$; **P*<0,05 vs. SO, SL, SR, SLM) a regiões com maior nível de marcação (SO=10,88 ± 2,31%; SL=21,44 ± 0,60%; SR=16,20 ± 1,55%; SLM=5,74 ± 1,79). Na segunda semana do desenvolvimento pós-natal (P10), a distribuição da Cx36 em CA3 ocorreu de forma mais homogênea nas camadas de CA3 (SPy = 27,58 ± 0,97%; **P*<0,01 vs. SO, SL, SR e SLM; SL=21,60 ± 0,97) devido ao aumento da frequência de marcação nas camadas SL (21,60 ± 0,97%; P<0,05 vs. SO, SPy e SR), e SLM (20,02 ± 0,42%; P<0,01 vs. SO, SPy e SR).

Da mesma forma que o perfil de distribuição da Cx36, o padrão de imunomarcação apresentou alterações em função do local e do período analisado. Imunomarcação durante o início do desenvolvimento pós-natal (P0 e P5) foi caracterizado por pontos maiores, que ocorrem principalmente na camada SPy de CA3. Além disso, a marcação puntiforme aconteceu próximo à região dos núcleos das células (Figura 15E, H-K, setas e cabeça de seta). Na segunda semana do desenvolvimento pós-natal (P10), a imunomarcação da Cx36 é caracterizada por pontos com tamanho homogêneo, que podem ser observados próximos ou afastados do núcleo celular (Figura 15N-Q, setas brancas e cabeças de seta).



Figura 15- Distribuição da Cx36 em CA3, nos diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal. (A) Imunomarcação de Cx36 (verde) na região CA3 de hipocampo de ratos P0, contracoradas com DAPI (azul). (B-C) Área amplificada da camada SPy de CA3 do hipocampo de animais P0. Esta camada apresentou alto nível de imunomarcação para Cx36 (setas brancas). (D-E) Área amplificada da camada SR de CA3 do hipocampo de animais P0. Identificamos uma marcação esparsa de Cx36 nesta camada(F) As análises de distribuição da Cx36 nas diferentes camadas de CA3 de P0, demonstraram que a marcação Cx36 encontra-se preponderantemente em SPy de CA3. (G) Imunolocalização da Cx36 (verde) na região CA3 de hipocampo de ratos P5, contracoradas com DAPI (azul). (H-I) Área amplificada da camada SPy de CA3 em P5. Nesta camada, o perfil de marcação ocorre de forma semelhante a P0 (setas brancas). (D-E) Área amplificada da camada SR de CA3 do hipocampo de animais P5. Assim como em P0, os níveis de imunorreatividade para Cx36 são menores nessa camada em relação à SPy. (L) As análises de distribuição da Cx36 em diferentes camadas de CA3 de hipocampos P5 evidenciaram um padrão de distribuição similar aos observados em P0. (M) Imunomarcação da Cx36 (verde) na região CA3 de hipocampo de ratos P10, contracoradas com DAPI (azul). (N-O) Área amplificada da camada SPy de CA3 do hipocampo de animais P10. Durante esse período, a imunomarcação da Cx36 caracterizou-se por um padrão de marcação de pontos esparsos e com menor variação de tamanho em relação aos outros períodos analisados (setas brancas). (P-Q) Área amplificada da camada SR de CA3 do hipocampo de animais P10. Os níveis de marcação da Cx36 em SR ocorrem com maior frequência em comparação com as idades anteriores avaliadas. (R) A análise de distribuição da Cx36 em camadas de CA3 de animais P10 demonstrou que a Cx36 apresenta-se distribuída de forma mais homogênea nas distintas camadas de CA3, em relação às idades anteriores estudadas. SO- stratum oriens; SPystratum pyramidale; SR- stratum radiatum; SLM- stratum lacunosum-moleculare. Barras representam o erro padrão da média. *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 em em Anova de uma via seguido de pós-teste Tukey. Barras de escala: 50 µm.

Do mesmo modo, as análises da imunolocalização da Cx45 em CA3 atestaram a existência de imunomarcação da Cx45 em toda CA3 nos períodos
Logo após o do desenvolvimento avaliados. nascimento (P0), а imunomarcação da Cx45 se sucedeu de forma predominante em SPy (SO=8,68 ± 1,43%; SPy=45,10 ± 3,34%; SL=17,24 ± 1,59%; SR=15,25 ± 3,22%; SLM=17,3 ± 0,94%; *P<0.001 SPy vs. SO, SL e SLM), com relação às outras camadas de CA3 (Figura 16). Na primeira semana do desenvolvimento pós-natal (P5), o padrão de distribuição da Cx45 foi alterado em relação a P0. Apesar da frequência da imunomarcação da Cx45 ser mais intensa em SPy (35,61 ± 3,48%; *P<0,01 vs. SO, SL e SR), a imunorreatividade de Cx45 também ocorreu de forma relativamente alta em SLM (25,63 ± 1,57%; *P<0,05 vs. SO e SR), em relação às demais camadas (SO=7,07 ±1,28%; SL=18,63 ± 2,06%; SR=13,05 ± 1,68%) de CA3 (Figura 16G-L). Em P10, o perfil de distribuição da Cx45 foi caracterizado por apresentar níveis altos de imunorreatividade em SPy (31,40 ± 2,41%; *P<0,01 vs. SO, SL, SR e SLM) e a aparente redução em SLM (21,11 ± 1,43%; P<0,05 vs.SO e SPy) em relação à proporção de marcação da Cx45 que ocorreu em SO (12,34 ± 1,5%; *P<0,05 vs. SL), SL (19,9 ± 0,48%; *P<0,05 vs. SO) e SR (15,25 ± 0,81) (Figura 16M-R).

Diferentemente do padrão de imunomarcação da Cx36, o padrão da Cx45, aparentemente, não foi encontrado alterado em função do período do desenvolvimento pós-natal ou da região onde estava localizado. Deste modo, a característica de marcação representada por pequenos pontos próximos e adjacentes ao núcleo celular permanece similar durante as idades avaliadas (Figura 16 B-E, H-K, N-Q, setas).



Figura 16- Imunolocalização da Cx45 em CA3, nos diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal. (A) Imunomarcação da Cx45 (verde) na região CA3 de hipocampo de ratos P0, contracoradas com DAPI (azul). (B-C) Área amplificada da camada SPy de CA3 do hipocampo de animais P0. Durante esse período observamos grande presença da Cx45 em SPy, caracterizada pela imunomarcação de pontos pequenos aglomerados, próximos ao núcleo das células situadas nesta área (setas). (D-E) Área amplificada da camada SR de CA3 do hipocampo de animais P0. A imunomarcação de Cx45 nesta camada é caracterizada por aglomerados esparsos, compostos de pequenos pontos de marcação (setas). (F) As análises de distribuição da Cx45, em diferentes camadas de CA3 de P0, demonstraram que a marcação da Cx45 prevaleceu em SPy de CA3. (G) Imunolocalização da Cx45 (verde) na região CA3 de hipocampo de ratos P5, contracoradas com DAPI (azul). (H-I) Área amplificada da camada SPy de CA3 em P5. Nesta área o perfil de marcação da Cx45 ocorreu de forma semelhante a P0 (setas). (D-E) Área amplificada da camada SR de CA3 do hipocampo de animais P5. Os níveis de imunorreatividade para Cx45 foram menores nessa camada em relação à SPy. (L) As análises de distribuição da Cx45 em diferentes camadas de CA3 de hipocampos P5 evidenciaram um padrão de distribuição caracterizado pela concentração de marcação em SPy e SLM, respectivamente. (M) Imunomarcação da Cx45 (verde) na região CA3 de hipocampo de ratos P10, contracoradas com DAPI (azul). (N-O) Área amplificada da camada SPy de CA3 do hipocampo de animais P10. Durante esse período, a imunomarcação da Cx45 caracterizou-se por um padrão semelhante às outras idades avaliadas (setas), (P-Q) Área amplificada da camada SR de CA3 do hipocampo de animais P10. Os níveis de marcação da Cx45 incidiram com frequência similar em comparação com as idades anteriores avaliadas. (R) A análise de distribuição da Cx45 em camadas de CA3 de animais P10 demonstrou que a Cx45 apresenta-se mais presente em SPy em relação às outras camadas de CA3. SO- stratum oriens; SPy- stratum pyramidale; SRstratum radiatum; SLM- stratum lacunosum-moleculare. Barras representam o erro padrão da média. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001em Anova de uma via seguido de pós-teste Tukey. Barras de escala: 50 µm.



4.6 Distribuição de Cx neuronais nas camadas de GD, em função do período do desenvolvimento pós-natal

Figura 17- Distribuição da Cx36 nas subáreas de GD, em diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal. (A) Imunolocalização da Cx36 (verde) na região GD de fatias de hipocampo de ratos P0, contracoradas com DAPI (azul). (B-C) Área amplificada da camada M e GCL de GD do hipocampo de animais P0. Na camada molecular do GD observamos uma distribuição irregular de imunomarcação da Cx36. Porém, a distribuição de marcação da Cx36 na GCL, ocorre deu forma homogênea. (D-E) Área amplificada do hilo de GD de animais P0. É possível observar uma densa marcação próxima aos núcleos de células situadas nessa região (setas). (F) Análise de distribuição da Cx36 em diferentes áreas de GD em P0. Nota-se que a Cx36 ocorreu de forma homogênea entre as camadas de GD. (G) Imunolocalização da Cx36 (verde) no GD de hipocampo de ratos P5, contracoradas com DAPI (azul). (H-I) Área amplificada da camada M e GCL do GD de hipocampo P5. O padrão de distribuição da marcação de Cx36 na GCL sucedeu de forma homogênea em relação à camada M do GD (setas brancas). (D-E) Área amplificada do hilo de GD do hipocampo de animais P5. Assim como P0. é possível observar densa imunomarcação perinuclear. Neste período, o perfil de imunomarcação de Cx36 se apresentou como pontos aglomerados como evidenciados em P0 (setas). (L) Análise de distribuição da Cx36 em diferentes camadas do GD de P5. Nossas análises revelaram que a Cx36 ocorreu mais frequente em GCL em relação a camada M. (M) Imunomarcação da Cx36 (verde) na região do GD de hipocampo de ratos P10, contracoradas com DAPI (azul). (N-O) Área amplificada da camada M e GCL de GD do hipocampo de animais P10. O padrão de imunomarcação da Cx36 ocorre de forma similar às idades anteriores. (P-Q) Área amplificada do hilo do GD de animais P10. Neste período, o padrão de marcação do hilo é demonstrado por pontos menos aglomerados e com tamanho relativamente constante (cabeça de setas). (R) Análise de distribuição da Cx36 em diferentes camadas do GD de animais P10. Nossas análises indicaram que a Cx36 apresentou frequência similar em todas as áreas de GD. M- Camada molecular; GCLcamada de células granulares. Barras representam o erro padrão da média. *P<0,05 em Anova de uma via seguido de pós-teste Tukey. Barras de escala: 50 µm.

As observações sobre o padrão de distribuição de imunomarcação da Cx36 na região do GD em P0 (M=28,87 ± 3,00%; GCL=36,49 ± 0,60%; hilo=34,64 ± 2,86), assim como em P10 (M=29.71 ± 0.58%; GCL=35.13 ± 1.42%; hilo=35.15 ± 1.90%) demonstraram que a Cx36 sucedeu-se de modo similar nas camadas dessa região durante essas idades. Porém, em P5 observamos que a Cx36 acumulou-se preferencialmente em GCL em relação à camada M (M=19.38 ± 2.49%; GCL=42.20 ± 3.98%; hilo=29.90 ± 4.24% **P*<0.01) (Figura 17).

Apesar do padrão de distribuição da Cx36 ocorrer de forma semelhante em diferentes camadas do GD, o perfil de marcação foi encontrado alterado ao longo do desenvolvimento pós-natal. Na primeira semana do desenvolvimento pós-natal (P0 e P5), a imunomarcação da Cx36 foi caracterizada por pontos de tamanhos variados (Figura 17B-E, H-K, setas). Em P10, o padrão de marcação da Cx36 foi caracterizado por pontos com tamanhos menores quando comparados com o padrão de marcação encontrados em idades anteriores (Figura 17 P-Q, setas).



Figura 18- Distribuição da Cx45 nas camadas do GD, em diferentes períodos do desenvolvimento pós-natal. (A) Imunolocalização da Cx45 (verde) na região GD de fatias de hipocampo de ratos P0, contracoradas com DAPI (azul). (B-C) Área

amplificada da camada M e GCL de GD do hipocampo de animais P0. Na camada M do GD, observamos uma distribuição irregular de imunomarcação da Cx45, que acompanha a distribuição dos núcleos das células localizadas nessa região. A distribuição em GCL ocorreu próxima aos núcleos das células de tal área (setas brancas). (D-E) Área amplificada do hilo de GD de animais P0. Assim como em GCL e na camada M do GD, foram encontrados níveis altos de imunomarcação da Cx45 adjacente aos núcleos de células situadas nessa região (setas brancas). (F) Análise de distribuição da Cx45 em diferentes camadas de GD em P0. Observamos que a Cx45 ocorreu de forma homogênea entre as camadas de GD. (G) Imunolocalização da Cx45 (verde) no GD de hipocampo de ratos P5, contracoradas com DAPI (azul). (H-I) Área amplificada da camada M, GCL e (J-K) hilo do GD de hipocampo P5. O padrão de distribuição da Cx45 sucedeu de forma semelhante a P0, nas três camadas do GD (setas brancas). (L) Análise de distribuição da Cx45 em diferentes camadas do GD de P5. Nossas análises demonstraram que a Cx45 ocorreu de forma homogênea em diferentes camadas do GD. (M) Imunomarcação da Cx45 (verde) na região do GD de hipocampo de ratos P10, contracoradas com DAPI (azul). (N-O) Área amplificada da camada M e GCL do GD de animais P10. Os níveis de imunorreatividade para Cx45 são menores na camada molecular em relação às demais camadas de GD (setas brancas). (P-Q) Área amplificada do hilo do GD de animais P10. Neste período, o padrão de marcação da Cx45 do hilo apareceu de forma similar às idades anteriores analisadas (setas brancas). (R) Análise de distribuição da Cx45 em diferentes camadas do GD de animais P10. Nossas análises demonstram que a Cx45 ocorreu com menor frequência na camada M em relação ao GCL e ao hilo. M- Camada molecular; GCLcamada de células granulares. Barras representam o erro padrão da média. *P<0,05 em Anova de uma via seguido de pós-teste Tukey. Barras de escala: 50 µm.

Por sua vez, o perfil de distribuição da Cx45 ocorre de forma diferenciada entre as diferentes camadas de P10, onde a camada M (21,49 $\pm 2,36\%$; *P*<0,05 vs. GCL e Hilo) do GD apresenta níveis menores dessa proteína, em comparação com GCL (40,07 \pm 1,31%) e hilo (38,44 \pm 1,45%) (figura 18N-Q). Em P0 (M=35,02 \pm 1,2%; GCL=33,52 \pm 3,36%; Hilo=31,45 \pm 3,16%) e em P5 (M=27,58 \pm 1,22%; GCL=36,03 \pm 1,72; hilo=36,3 9 \pm 2,94%). Dessa forma, não observamos diferenças significativas entre a distribuição da Cx45 em diferentes camadas de GD (Figura 18A-L).

4.7 A Cx36 encontra-se presente em células principais de CA e GD do hipocampo de animais recém-nascidos



Figura 19- Colocalização de CaMKIIa e Cx36 na camada de células principais de CA e GD no hipocampo de ratos P0. (A) Imunomarcação da Cx36 (verde) e CaMKIIα (vermelho) da região CA1 de hipocampo de ratos P0, contracorados com DAPI (azul). (B,F) Amplificação da região 1 e 2 de CA1 (A), evidenciando a marcação da Cx36 (verde) em SPy do hipocampo de P0. (C-G) Amplificação da região 1 e 2 (A), evidenciando a marcação da CaMKIIa (vermelho) em SPy do hipocampo de P0. (D,H) Amplificação da região 1 e 2 (A), evidenciando a marcação da Cx36 (verde) e CaMKIIa (vermelho) em SPy do hipocampo de P0. (E,I) Amplificação da região 1 e 2 (A), evidenciando a marcação da Cx36 (verde), CaMKIIα (vermelho) e DAPI (azul) em SPy do hipocampo de P0. Nossos resultados preliminares, de dupla marcação de Cx36 e CaMKIIa, sugerem a presenca de Cx36 nas células piramidais do hipocampo de animais P0 (setas brancas). (J) Imunomarcação da Cx36 (verde) e CaMKII (vermelho) da região de GCL/M do hipocampo de ratos P0, contracorados com DAPI (azul). (K, O) Imagem amplificada da região 1 e 2 (J), demonstrando a marcação da Cx36 (verde) em GCL do GD, em hipocampo de animal P0. (L, P) Imagem amplificada da região 1 e 2 (J), demonstrando a marcação da CaMKIIa (vermelho) em GCL do GD, em hipocampo de animal P0. (M,Q) Imagem amplificada da região 1 e 2 (J), demonstrando a marcação da Cx36 (verde) e CaMKIIa (vermelho) em GCL do GD, em hipocampo de animal P0. (N,R) Imagem amplificada da região 1 e 2 (J), apresentando a marcação da Cx36 (verde), CaMKIIa (vermelho) e DAPI (azul) em GCL do GD, em hipocampo de animal P0. GD- giro denteado; SO- stratum oriens; SPy- stratum pyramidale, SR- stratum radiatum; M- camada molecular do giro denteado; GCL- camada de células granulares. Imagens representativas de quatro experimentos realizados de forma independente (n=4). Barra de escala: 50 µm.

Por meio das análises de distribuição da Cx36 nas distintas camadas que formam as três principais regiões do hipocampo (CA1, CA3 e GD), observamos um adensamento preferencial nas camadas de células piramidais de CA1 e CA3. Além disso, no GD identificamos a presença da Cx36 na camada onde se concentram as células granulares, a GCL. Sendo assim, para identificarmos a presença de Cx36 nas camadas de células principais do hipocampo, aplicamos a técnica de imuno-histoquímica para obter a marcação simultânea de Cx36 e CaMKIIα, uma proteína presente em neurônios excitatórios (Benson, Isackson et al. 1991; Benson, Isackson et al. 1992). Em CA1, notamos que a CaMKIIα se concentrou de forma predominante na região superior de SPy durante esse período do desenvolvimento.

Nossas observações preliminares indicaram a sobreposição de Cx36 e de CaMKII, em SPy do CA (Figura 18A-I) e GCL do GD (Figura 19J-R), apontando a possível presença da Cx36 em células de projeção do hipocampo de ratos em P0. Além disso, por meio do delineamento neuronal propiciado pela CaMKIIα, notamos a Cx36 ocorrendo no soma ou processos próximos a esse compartimento celular (Figura 19 E,R).

4.8 A Cx45 encontra-se predominantemente localizada em células não gliais durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo

Por meio da técnica de dupla marcação utilizando anticorpos para Cx45 e GFAP, proteína presente em células gliais, foi possível analisar a distribuição da Cx45 em função das células gliais em hipocampos de neonatos (Figura 20). A imunolocalização de GFAP revelou a presença de células gliais majoritariamente concentradas no braço inferior de GD e nas camadas SLM de CA1 e CA3. Nas outras áreas do hipocampo, a frequência das células astrogliais é reduzida (Figura 20A-C).

Como confirmado pela análise de distribuição, a Cx45 está presente predominantemente na camada de células principais do hipocampo. Deste modo, grande parte da Cx45 identificada pela imunomarcação não está correlacionada com as áreas habitadas por células da glia. Apesar disso, em SLM de CA1 e CA3, área onde há a incidência de células gliais, a Cx45 também está presente (Figura 20G-H, L-M).

Por meio da análise de correlação, observamos uma baixa ocorrência de GFAP em relação à imunomarcação da Cx45. Porém, a incidência de células gliais sobre a marcação de GFAP se apresentou de forma considerável. Esse resultado demonstra que a Cx45 ocorre predominantemente em células não-gliais, ocorrendo possivelmente em neurônios, mesmo que ainda expressa por algumas células gliais (Figura 20S).



Figura 20- Cx45 ocorre preferencialmente em células não-gliais no hipocampo de ratos P0. (A) Imunomarcação da Cx45 (verde) e GFAP (vermelho) da região hipocampal de ratos P0. contracorados com DAPI (azul). (B) Imunomarcação da Cx45 (verde) da região hipocampal de ratos P0. (C) (A) Imunomarcação da Cx45 (verde) e GFAP (vermelho) da região hipocampal de ratos P0. Barra de escala = 100 µm. (D) Imunomarcação da Cx45 (verde) e GFAP (vermelho) da região CA1 do hipocampo de ratos P0, contracorados com DAPI (azul). (E) Área ampliada da região SPy de CA1 demonstrando a imunolocalização da Cx45 (verde). (F) Área ampliada da região SPy de CA1 demonstrando a imunolocalização da Cx45 (verde) e GFAP (vermelho). (G) Área ampliada da região SLM de CA1 demonstrando a imunolocalização da Cx45 (verde). (H) Área ampliada da camada SLM de CA1 demonstrando a imunolocalização da Cx45 (verde) e GFAP (vermelho). Observamos a ausência de sobreposição de Cx45 e GFAP em SPy, porém, em SLM, a Cx45 está colocalizada com GFAP. (I) Imunomarcação da Cx45 (verde) e GFAP (vermelho) da região CA3 do hipocampo de ratos P0, contracorados com DAPI (azul). (J) Área ampliada da região SPy de CA3 com a imunolocalização da Cx45 (verde). (K) Área ampliada da camada SPy de CA3 com a imunolocalização da Cx45 (verde) e GFAP (vermelho). (L) Área ampliada da camada SLM de CA3 demonstrando a imunolocalização da Cx45 (verde). (M) Área ampliada da camada SLM de CA3 demonstrando a imunolocalização da Cx45 (verde) e GFAP (vermelho). Nossas observações revelaram que em SPv a imunomarcação de Cx45 ocorreu fora das áreas marcadas pelo GFAP. E em SLM observamos a colocalização parcial entre os dois marcadores analisados. (N) Imunomarcação da Cx45 (verde) e GFAP (vermelho) da região do GD de ratos P0, contracorados com DAPI (azul). (O) Área ampliada da GCL/M do GD demonstrando a imunolocalização da Cx45 (verde). (P) Área ampliada da GCL/M do GD demonstrando a imunolocalização da Cx45 (verde) e GFAP (vermelho). (Q) Área ampliada do hilo do GD demonstrando a imunolocalização da Cx45 (verde). (R) Área ampliada do hilo do GD demonstrando a imunolocalização da Cx45 (verde) e GFAP (vermelho). Nossos estudos revelaram que em GCL a imunomarcação de Cx45 ocorreu fora das áreas marcadas pelo GFAP. No hilo observamos colocalização parcial entre os dois marcadores analisados. (S) Quantificação do coeficiente de Manders obtido a partir de imagens da região hipocampal. Nossos resultados apontaram uma baixa sobreposição entre Cx45 e GFAP. Porém, onde ocorreu a marcação de GFAP, também encontra-se relativamente correlacionado com a Cx45. Barras representam o erro padrão da média. GD- giro denteado; SO- stratum oriens; SPy- stratum pyramidale, SR- stratum radiatum; SLM- stratum lacunosum-moleculare; SL- stratum lucidum; M- camada molecular do giro denteado; GCL- camada de células granulares. Imagens representativas de guatro experimentos realizados de forma independente (n=4). Barra de escala: 50 µm.

4.9 O bloqueio das JCs por CBX acarreta em alterações na atividade de regiões mais ativas assim como de eventos de alta frequência de potenciais de ação (≥23 HZ) em hipocampo de animais neonatos (P0-P3) in vitro

Após identificarmos a existência de Cxs neuronais distribuídas de forma diferenciada no hipocampo em função do período do desenvolvimento pósnatal, avaliamos a função das JCs sobre o regime de atividade neuronal do hipocampo de neonatos (P0-3) e durante a segunda semana pós-natal (P8-10). Para isso, utilizamos fatias de hipocampo de ratos registradas em MEA sob condições controle (basal, perfusão com aCSF padrão) e submetidas ao bloqueador de JC de amplo espectro, o CBX. A utilização de MEA permitiu efetuar o registro de atividade elétrica extracelular por meio de 60 eletrodos distribuídos em uma área de aproximadamente 1,5 cm². Sendo assim, essa técnica permitiu executar o registro simultâneo de diferentes regiões que constituem o hipocampo, possibilitando a análise mais abrangente dos neurônios que compõem essa região.

Nossas análises revelaram que em hipocampos de animais neonatos (P0-3) o bloqueio das JCs por meio do CBX proporciona a redução do regime de potenciais de ação das áreas mais ativas do hipocampo identificadas durante o registro basal (CBX: $37,53 \pm 1,79\%$; **P*=0,00251 *vs.* basal). Além disso observamos uma redução dos eventos com frequência de potencial de ação igual ou superior a 23 Hz (CBX: $45,10 \pm 1,75\%$, ; **P*=0,035 *vs.* basal) após o bloqueio das JCs proporcionado pelo CBX. Porém, não observamos alterações significativas na frequência média de potenciais de ação do hipocampo como um todo (CBX: $0,697 \pm 1,56\%$; *P*=0,121 *vs.* basal) após o bloqueio das JCs por meio da aplicação de CBX (Figura 21).



Figura 21- Registros de atividade eletrofisiológica de fatias hipocampais de ratos P0-3 em MEA sob efeito de CBX. (A) Imagem de fatia de hipocampo P2 sobre eletrodos de MEA (barra de escala: 400 µm). (B) Registros da atividade basal e sob efeito de CBX 50 µM (C) com duração de 10 minutos respectivo a fatia de hipocampo P2 nos 60 eletrodos da matriz (escala: 200 µV, 5 minutos). (D) Registros expandidos da atividade basal (E) e da atividade sob efeito da CBX respectivo ao canal 16 localizado em CA3 (escala: 60 µV, 2 minutos). Eventos caracterizados por alta frequência de potenciais de ação (bursts) em (F) condição basal e (G) com bloqueio das JCs por CBX (escala: 60 µV, 200 ms). (H) Avaliação da média de frequência de potenciais de ação normalizada pelos valores obtidos no registro basal. Nossas análises demonstraram que a quantidade média de potenciais de ação registradas na região hipocampal de neonatos (P0-3) não são alteradas em função do bloqueio por CBX. (I) Análise da média da frequência de potenciais de ação do eletrodo mais ativo na região hipocampal normalizada pelo registro basal. Evidenciamos reduções significativas na atividade de áreas que apresentavam alta frequência de disparos de potenciais de acão após a exposição ao CBX. (J) Análise da quantidade de eletrodos ativos sob a região hipocampal normalizada pela condição basal. Nossas análises demonstraram a ausência de efeito sobre a quantidade de áreas ativas após a exposição da fatia ao CBX. (K) Avaliação da guantidade de eventos com freguência igual ou superior a 23 Hz, normalizada pela condição basal. Nossas análises demonstraram que atividades de alta frequência (≥23 Hz) foram reduzidas após a utilização de CBX. Registros foram submetidos ao filtro passa-alta 2-3 Hz, Butterworth de segunda ordem. Barras representam o erro padrão da média. *P<0,05 em Teste T de Student bicaudal pareado basal vs. CBX (n=5).

4.10 O bloqueio das JCs por CBX promove a diminuição de atividade em hipocampo de animais durante a segunda semana de vida (P8-10) in vitro

A fim de avaliar as possíveis diferenças da contribuição das JCs sobre a excitabilidade dos neurônios em diferentes períodos do desenvolvimento pósnatal, foram efetuados registros e analisadas as alterações exercidas pelo bloqueio das JCs sobre o regime de potenciais de ação das fatias de hipocampo de animais P8-10. Nossas análises mostraram que, de forma similar ao que ocorre no início do desenvolvimento pós-natal, o bloqueio das JCs acarreta na redução da atividade de áreas com alta taxa de disparo de potenciais de ação (CBX: $0,373 \pm 1,34\%$, **P*=0,0094 *vs*. basal), assim como na redução de eventos com frequência de disparo de potenciais igual ou superior a 23 Hz (CBX: $0,83 \pm 0,1\%$; **P*=0,0001 *vs*. basal).

Porém, diferentemente do efeito do bloqueio das JCs no hipocampo de animais neonatos, observamos uma redução significativa da frequência de potenciais de ação das áreas hipocampais registradas sob efeito da CBX (CBX: $40,44 \pm 0.93 \%$, **P*=0,0029 *vs*. basal). A pesar disso, não identificamos redução no número de eletrodos ativos após a exposição da fatia de hipocampo ao bloqueador CBX (CBX: 69,70 ± 1,10 %, *P*=0,09 *vs*. basal) (Figura 22).



Figura 22- Registros de atividade eletrofisiológica de fatias hipocampais de ratos P8-10 em MEA sob efeito de CBX. (A) Imagem de fatia de hipocampo P10 sobre eletrodos de MEA (barra de escala : 400 µm). (B) Registros da atividade basal e sob efeito de CBX 50 µM (C) com duração de 10 minutos respectivo a fatia de hipocampo P10 (escala: 100 µV, 5 minutos). (D) Registros expandidos da atividade basal (E) e da atividade sob efeito da CBX respectivo ao canal 26 localizado em SPy de CA3 (escala: 100 µV, 2 minutos). Eventos caracterizados por alta frequência de potenciais de ação (bursts) em (F) condição basal e (G) com bloqueio das JCs por CBX (escala: 70 µV, 200 ms). Notase uma redução no número de elementos de alta frequência após a exposição da fatia ao CBX. (H) Avaliação da média de freguência de potenciais de ação normalizada pelos valores obtidos no registro basal. Nossas análises demonstraram que a quantidade média de potenciais de ação registradas na região hipocampal de neonatos (P0-3) foram alteradas após o bloqueio das JCs por CBX. (I) Análise da média da frequência de potenciais de ação do eletrodo mais ativo na região hipocampal normalizada pelo registro basal. Identificamos uma redução significativa na atividade de áreas que apresentavam alta frequência de disparos de potenciais de ação após a aplicação de CBX. (J) Análise da quantidade de eletrodos ativos sob a região do hipocampal normalizada pela condição basal. Nossas análises demonstraram que CBX não exerceu efeito sobre a quantidade de áreas ativas. (K) Avaliação da quantidade de eventos com frequência igual ou superior a 23 Hz, normalizada pela condição basal. Nossas análises demonstraram uma grande redução em eventos de alta frequência (≥23 Hz) após a exposição ao CBX. Registros foram submetidos ao filtro passa-alta 2-3 Hz, Butterworth de segunda ordem. Barras representam o erro padrão da média. *P<0,05 em Teste T de Student bicaudal pareado basal vs. CBX (n=6).

4.11 O bloqueio das JCs compostas por Cx36 em fatias de hipocampo neonatos (P0-3) não promove redução no regime de atividade in vitro

Com intuito de avaliar a contribuição das JCs compostas por CX36 em diferentes períodos do desenvolvimento hipocampal, efetuamos registros utilizando MEA em fatias de hipocampo de animais neonatos (P0-3), e em animais com idades restrita ao período da segunda semana do desenvolvimento pós-natal (P8-10), sob efeito do bloqueador de canais de JCs formadas por Cx36, a mefloquina (Cruikshank et al., 2004).

De forma distinta do que ocorre nos hipocampos de animais neonatos (P0-3), o bloqueio das JCs formadas por Cx36 não promoveu alterações da atividade de áreas mais ativas identificadas no registro basal (mefloquina: $38,36 \pm 1,94\%$, **P*=0,0288 *vs*. basal), assim como no número de eventos de disparo de potenciais de ação superior ou igual a 23 Hz. (mefloquina: 41,14 ± 0,1,51%, **P*=0,00806 *vs*. basal). Além disso, não identificamos alterações significativas na frequência média total de potenciais de ação (63,76 ± 15,33, *P*=0,0771) e no número de canais ativos. (101,21 ± 3,65%, *P*=0,8099).



Figura 23- Registros de atividade eletrofisiológica de fatias hipocampais de ratos P8-10 em MEA sob efeito de mefloquina. (A) Imagem de fatia de hipocampo P0 sobre eletrodos de MEA (barra de escala = 400 µm). (B) Registros da atividade basal e sob efeito de mefloquina 50 µM (C) com duração de 10 minutos respectivo a fatia de hipocampo P0 (escala: 100 µV, 5 minutos). (D) Registros expandidos da atividade basal (E) e sob efeito da mefloquina respectivo ao canal 87 localizado em CA3 (escala: 100 µV, 2 minutos). Eventos caracterizados por alta frequência de potenciais de ação (bursts) em (F) condição basal e (G) com bloqueio das JCs por mefloquina (escala: 60 µV, 200 ms). Nota-se que, aparentemente, não alteração após a exposição da fatia a mefloquina. (H) Avaliação da média de frequência de potenciais de ação normalizada pelos valores obtidos no registro basal. Nossas análises demonstraram que a quantidade média de potenciais de ação registradas na região hipocampal de neonatos (P0-3) não foram alteradas após a exposição ao bloqueador mefloquina. (I) Análise da média da frequência de potenciais de ação do eletrodo mais ativo na região hipocampal normalizada pelo registro basal. Não observamos alterações na atividade de áreas que apresentavam alta frequência de disparos de potenciais de ação após a aplicação de mefloquina. (J) Análise da quantidade de eletrodos ativos sob a região do hipocampal normalizada pela condição basal. Nossas análises demonstraram que mefloquina não exerce efeito sobre a quantidade de áreas ativas. (K) Avaliação da quantidade de eventos com frequência igual ou superiores a 23 Hz normalizada pela condição basal. Nossas análises não foram capazes de mostrar alterações no número de eventos de alta frequência (≥23 Hz) após a exposição a mefloquina. Registros foram submetidos a filtro passa-alta 2-3 Hz, Butterworth de segunda ordem. Barras representam o erro padrão da média. P<0,05 em Teste T de Student bicaudal pareado basal vs. mefloquina (n = 5).

4.12 O bloqueio das JCs compostas por Cx36 em fatias de hipocampo de animais P8-10 promovem alterações na atividade neuronal in vitro

Para avaliar se as JCs compostas por Cx36 exercem influencias distintas em idades específicas do desenvolvimento pós-natal, analisamos a resultante do bloqueio das JCs neuronais compostas de Cx36 sobre a atividade em fatias de hipocampo neonatos de animais entre 8 e 10 dias de vida. De forma distinta do que ocorre em no hipocampo de neonatos, nossos resultados demonstram que o bloqueio dessas JCs promoveu alterações na frequência de potenciais de ação nas regiões mais ativas identificadas durante o registro da atividade basal (mefloquina: $38,62 \pm 1,94\%$, **P*=0,028), assim como em número de eventos com frequência de potenciais de ação igual ou superior a 23 Hz (mefloquina: $41,13 \pm 15,1\%$, **P*= 0,0080)(P8-10). Porém, diferente do efeito do CBX na mesma idade, a mefloquina não promoveu alterações na frequência média de potenciais de ação no hipocampo (mefloquina: $63,76 \pm 1,53$, *P*=0,0770) e de no número de eletrodos ativos ($101,21 \pm 3,65$, *P*=0,81) (Figura 24).



Figura 24- Registros de atividade eletrofisiológica de fatias hipocampais de ratos P8-10 em MEA sob efeito de mefloquina. (A) Imagem de fatia de hipocampo P10 sobre eletrodos de MEA (barra de escala: 400 µm). (B) Registros da atividade basal e sob efeito de mefloquina 50 µM (C) com duração de 10 minutos respectivo a fatia de hipocampo P10 (escala: 100 µV, 5 minutos). (D) Registros expandidos da atividade basal (E) e sob efeito da mefloquina respectivo ao canal 87 localizado em CA3 (escala: 100 µV, 2 minutos). Eventos caracterizados por alta frequência de potenciais de ação (bursts) em (F) condição basal e (G) com bloqueio das JCs neuronais por mefloquina (escala: 1000 µV, 200 ms). Nota-se que aparentemente ocorre uma alteração na frequência de potenciais de ação em regimes de burst após a exposição da fatia a mefloquina. (H) Avaliação da média de frequência de potenciais de ação normalizada pelos valores obtidos no registro basal. Nossas análises demonstraram que a quantidade média de potenciais de ação registrada na região hipocampal de neonatos não foi alterada após a exposição ao bloqueador mefloquina. (I) Análise da média da frequência de potenciais de ação do eletrodo mais ativo na região hipocampal normalizada pelo registro basal. Observamos uma redução na atividade de áreas que apresentavam alta frequência de disparos de potenciais de ação após a aplicação de mefloquina. (J) Análise da quantidade de eletrodos ativos sob a região hipocampal normalizada pela condição basal. Nossas análises demonstraram que mefloquina não favorece alterações sobre a quantidade de áreas ativas. (K) Avaliação da quantidade de eventos com frequência de potenciais de ação igual ou superiores a 23 Hz, normalizada pela condição basal. Nossas análises demonstraram uma redução no número de eventos (≥23 Hz) após a exposição à mefloquina. Registros foram submetidos ao filtro passa-alta 2-3 Hz, Butterworth de segunda ordem. Barras representam o erro padrão da média. P<0,05 em Teste T de Student bicaudal pareado basal vs. mefloquina (n=7).

Deste modo, nossos resultados indicaram que o bloqueio das JCs compostas por Cx36, acarreta em alterações distintas de acordo com o período do desenvolvimento pós-natal analisado.

5 DISCUSSÃO

5.1 A expressão gênica da Cx36 se apresenta mais elevada no hipocampo durante a primeira e segunda semana do desenvolvimento pós-natal

A partir da avaliação de expressão gênica, observamos que os transcritos da Cx36 estão presentes no hipocampo de ratos durante o desenvolvimento pós-natal. Além disso, a concentração de RNAm da Cx36 exibe níveis distintos, de acordo com o período do desenvolvimento pós-natal avaliado (Figura 9). Logo após o nascimento, a expressão da Cx36 ocorre de forma similar ao sucedido em animais adultos. Durante o decorrer da primeira e segunda semana pós-natal, os níveis dos transcritos da Cx36 são superiores a quantidade estabelecida no hipocampo de animais adultos. Valores similares foram registrados em análises dos níveis de marcação por hibridização *in situ,* durante o desenvolvimento do hipocampo (Belluardo et al., 2000).

Em outras regiões encefálicas, como hipotálamo, neocórtex, estriado e tálamo, a regulação dos níveis de transcritos da Cx36 apresentam dinâmicas similares em função do desenvolvimento pós-natal (Condorelli et al., 2000, Arumugam et al., 2005, Park et al., 2011). Esses trabalhos reportaram que o RNAm relativo a esse gene apresenta aumento gradativo de expressão até a segunda semana do desenvolvimento pós-natal, seguido de redução na terceira e quarta semana após o nascimento. (Belousov; Fontes, 2013).

Os mecanismos que coordenam o controle da expressão gênica da Cx36 estão atrelados às influências de atividades neuronais propiciadas por neurotransmissores e receptores sinápticos expressos durante o desenvolvimento encefálico. A ativação dos receptores metabotrópicos glutamatérgicos do grupo II (mGluRs grupo II), assim como a inibição do receptor GABA_A, promovem o aumento da expressão da Cx36 durante o desenvolvimento pós-natal (Arumugam et al., 2005, Park et al., 2011).

Especificamente, a ativação do receptor GABA_A, durante o início do desenvolvimento pós-natal, leva a despolarização neuronal promovida pela saída de Cl⁻ pelo receptor ionotrópico, ocasionando a abertura de canais voltagem-dependentes para Ca²⁺ do tipo L. Por sua vez, o influxo de Ca²⁺ favorece a ativação da proteína quinase dependente de cálcio (PKC). Assim, a

ativação dos receptores mGluRs grupo II conduz a síntese de AMPc seguida da ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA; via AMPc/PKA). Ambas as cascatas atuam de forma antagônica na remoção do fator de silenciamento transcricional- R1 (REST) do sítio NRSE, localizado na região promotora do gene da Cx36. Deste modo, as modificações ocorridas durante o desenvolvimento do hipocampo, como a transição da função excitatória para inibitório do receptor GABA_A, em conjunto com o aumento da atividade dos receptores mGluRs grupo II, poderiam articular a modulação do aumento da expressão da Cx36 durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo (Martin et al., 2003, Park et al., 2011).

Por fim, o reestabelecimento dos níveis de transcritos encontrados em P0 após a segunda semana do desenvolvimento pós-natal (Figura 8D), é permitido pelo aumento progressivo das interações sinápticas, sobretudo pela comunicação via receptores NMDA. A ativação desses receptores impulsiona a elevação do Ca²⁺ intracelular, favorecendo a ativação de cascatas intracelulares via CaMKII e PKC, resultando na intensificação da expressão da CREB. Esse mecanismo estabelece a repressão da expressão gênica da Cx36 (Kandler, Katz, 1998. Arumugam et al., 2005,).

5.2 A Cx45 é altamente expressa durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo

Assim como a Cx36, nossos estudos demonstraram a existência de transcritos da Cx45 em todos os períodos investigados. Porém, diferentemente da Cx36, a Cx45 exibe elevada expressão gênica perinatal em relação ao hipocampo adulto (Figura 9). Em regiões do sistema nervoso central, como mesencéfalo, neocórtex, cerebelo e retina, a Cx45 apresenta-se altamente expressa durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal de roedores (Leung et al., 2002, Maxeiner et al., 2003, Kihara et al., 2006b, Cina et al., 2007).

A partir da criação de camundongos geneticamente modificados, onde a região codificante da Cx45 é substituída pelo gene da β-galactosidase bacteriana (LacZ), Maxeiner et al. (2003) reportaram elevada expressão da Cx45 no desenvolvimento hipocampal, predominantemente localizada na SPy do CA. Porém, na segunda semana do desenvolvimento pós-natal, os níveis de

imunomarcação para o gene repórter mostraram-se reduzidos em relação às idades anteriores ao nascimento, reportados e restritos a região de CA3 em animais adultos.

Os mecanismos que controlam a expressão da Cx45 podem estar relacionados aos eventos do desenvolvimento. Rozental et al. (2000) identificaram a correlação entre eventos ocorridos durante o desenvolvimento celular e a modulação da expressão gênica da Cx45. A indução da diferenciação neuronal promovida por citocinas, como a interleucina 7 (I-7), levam a alterações na expressão de Cxs em células precursoras neuronais imortalizadas do hipocampo. A partir disso, foi identificado que estágios distintos de diferenciação e maturação de neurônios hipocampais induzem a expressão de Cxs. Períodos intermediários da diferenciação neuronal promovem a expressão de Cxs distintas, dentre elas a Cx45. Desta forma, os mecanismos que proporcionam a diferenciação neuronal, possivelmente, contribuem para regulação da expressão gênica da Cx45 (Rozental et al., 2000).

Sendo assim, os perfis de expressão da Cx36 e Cx45 observados neste trabalho, possivelmente refletem o produto dos diferentes mecanismos atrelados à progressão da maturação neuronal obtidos a cada instância do desenvolvimento pós-natal do hipocampo.

5.3 Os níveis proteicos da Cx36 e da Cx45 encontram-se reduzidos durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo

Apesar da existência de estudos relacionados à expressão gênica utilizando técnicas diversas, informações referentes à densidade proteica da Cx36 e Cx45 restritas ao hipocampo durante o desenvolvimento pós-natal ainda não haviam sido reportadas (Belluardo et al., 2000, Rozental et al., 2000, Weickert et al., 2005). Nossos resultados constataram que, embora os níveis de RNAm da Cx36 e Cx45 sejam abundantes durante a primeira e segunda semana do desenvolvimento pós-natal (Figura 9), os níveis proteicos das Cxs correspondentes encontram-se baixos em relação ao hipocampo de ratos adultos (Figura 10).

A discrepância entre a quantidade de transcritos e os níveis de proteína de ambas as Cxs avaliadas não está restrita ao desenvolvimento hipocampal.

Em modelos de neurodegeneração (Oguro et al., 2001, Paschon et al., 2012), hiperexcitabilidade neuronal (Condorelli et al., 2003), regulação sensorial (Kihara et al., 2006a) e em células específicas do sistema nervoso, como os neurônios sensoriais olfativos do bulbo olfatório (Rash et al., 2005), a Cx36 e a Cx45 exibem clara incompatibilidade entre os níveis de transcritos e proteína.

Assim, nossos resultados sugerem a existência de mecanismos póstranscricionais de regulação da tradução da Cx36 e Cx45, durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo. Ainda que não haja mecanismos de regulação pós-transcricionais descritos para Cx36 e Cx45, alguns dados indicam que essa hipótese é plausível. Park e colaboradores (2011) demonstraram que a região não traduzida da extremidade 3' (3'UTR) do RNAm da Cx36 é essencial para a indução da diminuição da tradução dependente da ativação de receptores.

Os microRNAs (miRNAs), classe de RNAs não codificantes, são conhecidos por interagir com a região 3'UTR de RNAms, proporcionando a repressão (via inibição ou degradação) da tradução do RNAm alvo. Apesar de, até o momento, não terem sido identificados miRNAs com compatibilidade de interação com os transcritos da Cx36 e Cx45 em *Rattus novergicus*, em camundongos alguns miRNAs, identificados no sistema nervoso, foram preditos em atuar sobre o RNAm da Cx36 (miR-466h) e Cx45 (miR-709), levando a crer que os avanços nos estudos de identificação e funcionamento dos miRNAs possam contribuir no entendimento dos meios por onde essa regulação ocorre (Higa et al., 2014).

Em conjunto, nossos resultados referentes à expressão gênica e aos níveis proteicos das Cxs avaliadas, apontam que ambas são amplamente reguladas por mecanismos que atuam sobre a transcrição, assim como na tradução durante o desenvolvimento pós-natal de hipocampo de ratos. 5.4 A Cx36 possui distribuição constante em CA1, CA3 e GD durante o desenvolvimento, estando presente em neurônios principais durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo

Depois de verificarmos os níveis de expressão gênica e os níveis proteicos, decidimos investigar o perfil de distribuição de ambas as Cxs nas três principais regiões do hipocampo, CA1, CA3 e GD, durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo.

Detectamos a Cx36 nas três regiões, sendo sua densidade de distribuição similar e pouco alterada em função do desenvolvimento (Figura 11). Observamos apenas uma pequena alteração na segunda semana do desenvolvimento pós-natal, onde a Cx36 se encontrou mais concentrada em GD, seguida da região CA3 e CA1.

No GD, apesar de ser uma região onde há intensas modificações marcadas pela proliferação celular durante o desenvolvimento pós-natal (Belluardo et al., 2000, Rozental et al., 2000), a Cx36 exibe imunomarcação constante caracterizada pela distribuição similar entre as camadas do GD (M, GCL, hilo). Apesar da Cx36 apresentar variações sutis de distribuição entre as regiões avaliadas, a distribuição dessa Cx não ocorre de forma homogênea entre as camadas do CA. Em CA3 e CA1, evidenciamos a imunomarcação da Cx36 concentrada especialmente em SPy, durante a primeira e segunda semana do desenvolvimento após o nascimento. Porém, notamos que com o decorrer do desenvolvimento, o perfil de imunomarcação da Cx36 se torna mais distribuído em CA1 e CA3, sendo propiciado pela redução em SPy e aumento nas outras camadas de CA. De forma simultânea, a marcação puntiforme característica das Cxs sofre modificações, passando de pontos densos e próximos, para pontos menores e esparsos.

Curiosamente, grande parte das informações referentes à Cx36 durante o desenvolvimento hipocampal se limita a análises de expressão gênica e a escassa investigação que visa caracterizar os padrões de distribuição proteica da Cx36 no desenvolvimento do hipocampo (Belluardo et al., 2000, Zeinieh et al., 2010). Entretanto, existe uma considerável quantidade de informações relacionadas à localização da expressão da Cx36 no hipocampo de animais adultos. Neste período, a Cx36 está presente em sinapses mistas, entre fibras musgosas originadas pelas células granulares do GD e células piramidais de CA3, em neurônios piramidais de CA3, e em interneurônios parvalbumina positivos (PV) distribuídos em diferentes regiões do hipocampo (Kosaka, Hama, 1985, Belluardo et al., 2000, Baude et al., 2007, Nagy, 2012).

De forma distinta do hipocampo adulto, encontramos uma alta concentração de imunomarcação limitada à camada de células principais, especialmente em CA1 e CA3, período em que interneurônios são relativamente imaturos e pouco frequentes em SPy e GCL (Seress ,Ribak, 1988, Seress, Ribak, 1990). Para investigar a localização da Cx36 nos neurônios principais do hipocampo durante o desenvolvimento pós-natal, aplicamos a técnica de dupla marcação utilizando o anticorpo para CaMKIIα, proteína expressa por neurônios excitatórios. Nossos resultados evidenciaram a presença da Cx36 em células excitatórias, localizados nas camadas de células principais do hipocampo, logo após o nascimento (Figura 19).

Sendo assim, nossas observações levam a crer que o padrão de distribuição entre as camadas de CA1 e CA3 são alteradas em função do desenvolvimento, sendo sua expressão estendidas a células principais de CA1, CA3 e GD.

5.5 A Cx45 está amplamente distribuída no hipocampo durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo, sendo expressa majoritariamente por neurônios no período perinatal

Nossos resultados relativos à Cx45 revelaram que, assim como a Cx36, sua distribuição abrange todas as sub-regiões do hipocampo, durante o desenvolvimento pós-natal. Além disso, o padrão de localização mostrou-se similar, apenas exibindo uma maior concentração em GD, em comparação com CA1 e CA3, durante a segunda semana do desenvolvimento pós-natal (Figura 12). No entanto, assim como a Cx36, nossas análises mostraram que a distribuição da Cx45 entre as camadas que compõem cada sub-região do hipocampo, não ocorre por igual (Figuras 14,16).

Em CA1 e CA3 a imunomarcação da Cx45 revelou-se concentrada principalmente em SPy, durante as primeiras semanas do desenvolvimento pós-natal. Porém, em CA1 notamos uma intensificação da imunorreatividade em SLM, quando comparadas às outras camadas dessa região, durante a primeira semana após o nascimento (P0 e P5). Em CA1, a imunomarcação manteve-se concentrada principalmente em SPy na segunda semana do desenvolvimento pós-natal, porém em CA3, a disposição da Cx45 se torna mais dispersa ao decorrer do desenvolvimento pós-natal, se tornando menos restrita a SPy. Diferentemente das regiões do CA, a Cx45 apresentou-se organizada de forma relativamente homogênea nas camadas de GD, em função dos diferentes períodos avaliados (Figura 14 e 16).

Nossos resultados corroboram com os dados de estudos relativos à expressão da Cx45 durante o desenvolvimento encefálico de roedores. Maxeiner et al. (2003) demonstraram que essa Cx é abundantemente expressa durante o desenvolvimento (P8) das três regiões hipocampais avaliadas. A despeito de não haver uma quantidade significativa de estudos referentes ao padrão de expressão da Cx45 durante o desenvolvimento, alguns trabalhos se empenharam em caracterizar a expressão da Cx45 no hipocampo de animais adultos.

Os trabalhos provenientes de análises do hipocampo adulto indicam que a Cx45 não se encontra expressa em células gliais e em interneurônios PV, estando sua expressão restrita aos neurônios piramidais de CA3 e CA4 (Maxeiner et al., 2003, Weickert et al., 2005). Sendo assim, apesar de identificarmos a Cx45 majoritariamente em áreas onde ocorre aglomeração do soma de células neuronais, como no hipocampo de ratos adultos, decidimos investigar se a Cx45 ocorre exclusivamente em neurônios de hipocampos P0, já que essa proteína foi identificada em células não neuronais em outras áreas do sistema nervoso (Giaume et al., 2013). Nossos resultados mostraram que, mesmo havendo colocalização entre o marcador de células astrogliais (GFAP) e a Cx45, os níveis de sobreposição dos dois marcadores não acontecem de forma frequente (Figura 19), sendo provável que durante o desenvolvimento a Cx45 seja uma proteína traduzida principalmente em neurônios. Curiosamente, em SLM de CA1, camada onde constatamos certa concentração da Cx45, pudemos evidenciar grande parte da esporádica colocalização entre GFAP e Cx45.

A camada SLM de CA1 é uma área onde há concentração de interneurônios inibitórios, regulados por eferências talâmicas, do córtex entorrinal e da colateral de Schaffer. Os interneurônios alocados nesta camada estabelecem sinapses inibitórias com neurônios piramidais, além de serem eletricamente acoplados durante o período que abrange o desenvolvimento pós-natal (Zsiros ,Maccaferri, 2005). Sendo assim, é presumível que a Cx45 possa acoplar células gliais e neurônios inibitórios contidos em SLM de CA1.

Deste modo, os dados revelam que a Cx45 apresenta níveis similares de proteína entre as diferentes regiões do hipocampo, sendo que sua concentração ocorre de forma predominante na camada de células principais do CA, e de forma ubíqua em GD. Levando em conta sua baixa colocalização com células gliais, a Cx45 possivelmente possibilita a formação de JCs neuronais durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo.

5.6 O perfil de distribuição da Cx36 e da Cx45 pode ser dependente do estágio de maturação dos neurônios hipocampais

Em conjunto, nossos resultados revelaram uma complexa rede de regulação da Cx36 e Cx45 que possibilita a formação de JCs neuronais durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo. Essa rede contempla diferentes camadas de modulação que atingem desde a regulação transcricional, até a distribuição das Cxs nas diferentes áreas do hipocampo.

Notavelmente, observamos uma tendência de aumento progressivo da dispersão de Cxs durante o desenvolvimento pós-natal. A ocorrência das Cxs nas camadas extrapiramidais do CA ocorre simultaneamente com o desenvolvimento da arborização dos neuritos durante o desenvolvimento hipocampal. Nesse período, o maior contingente de neurônios piramidais (80%) apresenta escassa ramificação dendrítica, apresentando apenas o primórdio do dendrito apical que se projeta para SR (Tyzio et al., 1999). A maturação neuronal, em ratos, ocorre intensamente no desenvolvimento pós-natal, atingindo níveis adultos após o primeiro mês de vida (Pokorny; Yamamoto, 1981, Ben-Ari, 2001). Do mesmo modo, os interneurônios GABAérgicos do hipocampo apresentam pouca ramificação dendrítica e axonal no início do desenvolvimento pós-natal (Seress, Ribak, 1990, Gaiarsa et al., 2001). Sendo assim, é possível que a Cx36 e a Cx45, expressas pelos neurônios hipocampais, apresentam-se alocadas em área celular reduzida próxima ao corpo celular, formando aglomerados de placas de JCs, durante o período perinatal. Com o amadurecimento neuronal progressivo caracterizado pelo aumento da ramificação dos dendritos e, consequentemente, pelo aumento da

95

área de superfície do neurônio, as Cxs podem se alocar nos compartimentos celulares recém-formados, proporcionando a dispersão de distribuição observada ao longo do desenvolvimento do hipocampo (Figura 25).



Figura 25- Modulação espaço-temporal das Cxs neuronais na região hipocampal de CA durante o desenvolvimento pós-natal de ratos. Em P0 (esquerda), a população neuronal do hipocampo (interneurônios e neurônios piramidais) apresenta pouca ramificação dos neuritos. Durante este período, a Cx36 e a Cx45 são encontradas principalmente em SPy de CA1 e CA3. Em CA1, a Cx45 também está presente em SLM. Porém, em P10 (direita), a população neuronal do hipocampo apresenta neuritos com maior complexidade. Concomitantemente a isso, a Cx36 encontra-se mais frequente em camadas extrapiramidais e ocorre de forma menos agrupada. Por sua vez, a Cx45 ocorre com maior frequência em SPy de CA1 em relação às outras camadas dessa região. Porém, em CA3, a Cx45 apresenta uma distribuição mais homogênea ocorrendo com maior frequência em camadas extrapiramidais.

Esta hipótese poderia explicar não apenas a dinâmica de alteração identificada nos perfis de distribuição das Cxs neuronais em função do desenvolvimento, mas também o favorecimento do acoplamento entre neurônios durante o desenvolvimento hipocampal, servindo como um mecanismo compensatório para os reduzidos níveis proteicos totais da Cx36 e Cx45, identificados durante o desenvolvimento. O aglomerado propiciado pela restrição da área neuronal pode ser um mecanismo que possibilita o aumento da probabilidade da JC apresentar-se funcional (Bukauskas et al., 2000). Por sua vez, no GD observamos uma constante marcação de Cx36 e Cx45, durante todo desenvolvimento hipocampal, sendo possível que essas Cxs atuem na formação do acoplamento das células do GD durante o processo de intensa proliferação celular, ocorrido durante esse período do desenvolvimento (Strata et al., 1997).

Muitos estudos suportam a existência de JCs entre neurônios hipocampais, durante o desenvolvimento e a fase adulta, evidenciados por

meio de análises de ultraestrutura e avaliação de acoplamento elétrico e metabólico (MacVicar, Dudek, 1980; MacVicar, Dudek, 1982; MacVicar et al., 1982; Strata et al., 1997; Venance et al., 2000; Mercer et al., 2006; Munster-Wandowski et al., 2013). Deste modo, nossos resultados apontam que a Cx36 e a Cx45 poderiam atuar na formação de JCs funcionais no hipocampo.

5.7 O bloqueio das JCs pelo bloqueador de amplo espectro promove a regulação da excitabilidade hipocampal do hipocampo durante o desenvolvimento pós-natal

A partir da identificação das alterações ocorridas nos diferentes níveis de regulação da Cx36 e Cx45 durante períodos específicos, que abrangem o início do desenvolvimento pós-natal do hipocampo, decidimos avaliar o papel das JCs na modulação da excitabilidade dessa região em dois momentos distintos; entre 0 e 3 dias de idade e em hipocampos de animais com idade entre 8 e 10 dias de vida. Esses períodos foram determinados de acordo com a identificação de padrões distintos de distribuição das Cxs neuronais.

Para isso optamos pela utilização de MEA, visando obter registros simultâneos de virtualmente de todas as áreas que compõem o hipocampo, por meio do registro de fatias de hipocampo sob o efeito do bloqueador de amplo espectro para JCs, o CBX. Apesar de alguns estudos reportarem que a ação desse composto não se restringe ao bloqueio das JCs (Juszczak ,Swiergiel, 2009), a utilização de CBX em registro de fatias de hipocampo de animais neonatos não promove alterações diretas sobre correntes sinápticas, assim como nas propriedades neuronais de disparo de potencial de ação (Huupponen et al., 2013, Molchanova et al., 2016).

Sendo assim, através do emprego do CBX identificamos que, em ambos os períodos analisados, as regiões hipocampais com altos níveis de atividade sofreram redução no seu regime de disparo de potenciais de ação, proporcionado pelo bloqueio das JCs. Além disso, o CBX reduziu o número de eventos com frequência igual ou superior a 23 Hz de disparo de potenciais de ação (Figura 23 e 24). Além do mais, em fatias de hipocampo de animais com idade restrita a segunda semana de vida, identificamos uma diminuição da frequência do regime médio de disparo de potenciais de ação no hipocampo,

após a indução do bloqueio das JCs pelo CBX. Em conjunto, esses resultados demonstraram que as JCs regulam a excitabilidade hipocampal, principalmente de sub-regiões mais ativas.

Em estudos conduzidos durante o desenvolvimento do hipocampo, Strata et al. (1997) identificaram um grupo de interneurônios acoplados e constantemente ativos na região do hilo. A indução do bloqueio das JCs promoveu a dessincronização da atividade rítmica de disparos de potenciais de ação dessas células. Como consequência do desacoplamento, foi observado uma redução de eventos GDP, que tem como característica a presença de disparos rápidos de potenciais de ação (bursts). Esses achados corroboram com nossas observações que demonstram que, sob efeito do CBX, as fatias de hipocampo em ambas as idades analisadas, promovem redução dos eventos com frequência igual ou superior a 23 Hz de disparos de potenciais de ação. Dessa forma, a redução nesses eventos podem estar relacionadas com a redução da excitabilidade neuronal promovida, em parte, pela redução da liberação sincronizada de GABA, o principal neurotransmissor excitatório durante o início do desenvolvimento pós-natal no sistema nervoso (Ben-Ari, 2002). Consequentemente, o bloqueio das JCs acarretaria na diminuição da probabilidade de disparo de potencial de ação de seus neurônios alvos.

Além disso, a ação do CBX sobre a diminuição da excibilidade hipocampal, pode ser promovida pela redução do acoplamento entre neurônios piramidais. O bloqueio das JCs promove a redução e alterações no padrão do disparo espontâneo de potencial de ação em neurônios de CA3, durante a primeira semana do desenvolvimento do hipocampo. Todavia, essas alterações auxiliam na diminuição dos eventos em *burst* registrados em CA3 (Molchanova, et al., 2016).

Deste modo, nossos achados apontam que o acoplamento via JC entre os neurônios das diferentes áreas do hipocampo de animais neonatos consistem em uma importante via de comunicação para manutenção da excitabilidade da rede hipocampal. 5.8 Fatias de hipocampo de animais P8-10 apresentam maior sensibilidade a alterações na excitabilidade promovida pelo bloqueio das JCs formadas pela Cx36

Após identificarmos o papel das JCs sobre a atividade hipocampal em idades distintas do desenvolvimento pós-natal, decidimos avaliar o papel das JCs formadas especificamente pela Cx36 sobre a excitabilidade da rede hipocampal nos mesmos períodos reportados anteriormente (P0-3 e P8-10). Para isso, utilizamos o bloqueador mefloquina para mediar essa investigação. Apesar da mefloquina ser um potente bloqueador de Cx36 e Cx50 (Cx não expressa no hipocampo de ratos), assim como o CBX, sua ação não está restrita as JCs (Cruikshank, et al., 2004). Porém, esse composto apresenta efeitos colaterais distintos do CBX. Sendo assim, a resultante comum de ambas as drogas geralmente está atrelada ao efeito sobre as JCs compostas pela Cx36, permitindo a exclusão de possíveis efeitos estão além da ação sob as JCs.

Deste modo, nossas análises revelaram que em fatias de hipocampo de neonatos a mefloquina não promove alterações significativas na excitabilidade da população neuronal do hipocampo (Figura 24). Curiosamente, em hipocampo de animais entre 8 e 10 dias de vida, identificamos que o bloqueio das JCs constituídas pelas Cx36 promoveu a redução na frequência de potenciais de ação nas regiões mais ativas, assim como no número de eventos com frequência igual ou superior a 23 Hz de disparo de potenciais de ação.

Esses resultados apontam que as JCs compostas pela Cx36 apresentam maior peso sobre a modulação da atividade hipocampal, em idades posteriores a primeira semana do desenvolvimento pós-natal. Em contrapartida, estudos anteriores apontaram a existência de JCs funcionais compostas pela Cx36 durante o início do desenvolvimento pós-natal do hipocampo. Um estudo realizado por Crépel et al. (2007) mostraram que as JCs neuronais são cruciais para a expressão dos primeiros eventos de atividade sincronizada entre neurônios de CA1, as SPAs. Esta atividade é induzida pela orexina liberada durante o evento do parto. Análises utilizando o bloqueador mefloquina indicaram que esse padrão de atividade sincronizada presente entre alguns neurônios é extinto após o bloqueio das JCs compostas por Cx36.

Sendo assim, apesar da presença das JCs formadas pela Cx36 durante esse período do desenvolvimento, é possível que o bloqueio isolado das JCs formadas por essa Cx apresente menor impacto sobre a regulação da excitabilidade hipocampal em idades próximas ao nascimento. Curiosamente, durante esse período, identificamos que a Cx36 está localizada nas mesmas camadas do hipocampo ocupadas pela Cx45 (Figura 25). Graças a esta constatação, é possível que as JCs formadas pela Cx45 promovam um efeito compensatório mais eficaz, permitindo a manutenção da excitabilidade hipocampal. Entretanto, este efeito compensatório dado pela Cx45 no início do desenvolvimento, poderia ser amenizado pela alteração da distribuição da de ambas Cxs, que poderia estar relacionado ao estabelecimento do acoplamento de compartimentos neuronais distintos. Notavelmente, em animais KO para Cx36 ou Cx45, a ausência do acoplamento propiciado por essas Cxs, promove alterações brandas no regime de disparo de potenciais de ação dos neurônios ganglionares da retina. Contudo, essas alterações são potencializadas em animais duplo KO para Cx36 e Cx45, indicando a existência de mecanismos compensatórios proporcionados pelas JCs, formadas por ambas Cxs neuronais (Blankenship et al., 2011).

5.9 O acoplamento promovido pelas Cxs neuronais promovem a regulação da excitabilidade hipocampal de formas distintas durante o desenvolvimento pósnatal do hipocampo

Como evidenciado em outros estudos, as JCs são importantes moduladores da atividade hipocampal durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos (Strata et al., 1997, Crepel et al., 2007, Molchanov et al., 2016,). Porém, a avaliação de sua contribuição em idades específicas do desenvolvimento pós-natal do hipocampo, período de alterações no padrão de distribuição das Cxs neuronais, ainda não havia sido determinada.

Em conjunto, nossos resultados indicam que tanto no início do desenvolvimento pós-natal quanto durante a segunda semana após o nascimento, a comunicação via JC promove a modulação da excitabilidade do hipocampo e, consequentemente, a regulação de eventos de alta frequência gerados por disparos rápidos de potenciais de ações. Além disso, o padrão de distribuição proteico distinto durante esse período do desenvolvimento poderia

favorecer a formação de JCs compostas por Cx36 e Cx45 em sítios hipocampais similares nos primeiros dias após o nascimento, sendo esse padrão parcialmente alterado ao longo do desenvolvimento. Essas alterações poderiam possibilitar modulações distintas impostas pelas diferentes Cxs neuronais sobre a regulação da atividade hipocampal, através de mecanismos que permitem a sincronização neuronal.

Apesar dos canais de JCs apresentarem propriedades eletrofisiológicas que as determinam como filtros passa-baixa, devido a tendência que apresentam em diminuir sua permeabilidade de acordo com a variação de voltagem transjuncional, as JCs podem contribuir para a sincronização de oscilações sub-limiares que possibilitam o aumento da probabilidade de disparo conjunto quando despolarizadas por aferências comuns (Sohl et al., 2005). Ainda assim, caso ocorra à sincronização do disparado de ambos os neurônios acoplados, os canais podem favorecer a comunicação por meio do aumento da permeabilidade do canal de JC, favorecendo a expressão de eventos de alta frequência (Zlomuzica et al., 2010). Além da ação sincronizada promovida por essa via de comunicação, as JCs podem propiciar o aumento da capacitância de neurônios acoplados que, como consequência, atua no aumento de sua resistência a correntes provindas de suas aferências, possibilitando a regulação da excitabilidade individual de neurônios acoplados (Molchanova et al., 2016).

Através desses mecanismos, as Cxs neuronais podem favorecer a manutenção apropriada da atividade de rede do hipocampo durante tal período do desenvolvimento, permitindo a expressão dos padrões de atividade sincronizada no hipocampo, como as GDPs. Consequentemente, as JCs poderiam contribuir, por meio da modulação da atividade, para formação da circuitaria hipocampal (Lauri et al., 2003, Mohajerani ,Cherubini, 2006, Kirkby et al., 2013). Além disso, as JCs podem atuar na regulação das flutuações de cálcio, que promove a ativação de proteínas que atuam no crescimento e estabilidade dos neuritos (Lohmann et al., 2005). Deste modo, a Cx36 e a Cx45, identificadas durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo, poderiam auxiliar para modulação da atividade, assim como para a regulação do cálcio intracelular, por meio da troca do IP₃ ou do próprio íon Ca²⁺, permitindo dessa maneira o desenvolvimento apropriado da circuitaria

hipocampal, como identificado em outras áreas do sistema nervoso central (Blankenship et al., 2011).

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que:

 A expressão gênica da Cx36 e Cx45 ocorre durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo, apresentando elevados níveis de transcritos em relação ao hipocampo adulto;

• Os níveis proteicos das Cxs estudadas são encontrados baixos em hipocampos de animais neonatos em relação ao adulto;

 A discrepância entre os níveis de transcritos e os níveis proteicos da Cx36 e Cx45 aponta a atuação de possíveis mecanismos pós-transcricionais durante o desenvolvimento do hipocampo;

 As Cxs estudadas encontram-se mais concentradas em SPy, exibindo uma tendência de dispersão, possivelmente conduzida pela maturação dos neurônios durante o desenvolvimento do hipocampo;

• Os níveis e a distribuição das Cxs em GD são relativamente estáveis, sendo distribuída de forma homogênea entre as camadas dessa região;

• A Cx45 ocorre esporadicamente em células gliais, sendo possível que sua expressão ocorre principalmente em neurônios de hipocampo de neonatos;

 A Cx36 está presente em células principais do hipocampo, demonstrando que as células piramidais e células granulares podem formar JCs formadas por essa Cx em neonatos;

 A Cx36 e Cx45 possivelmente estão envolvidas na formação de JCs entre neurônios durante o desenvolvimento hipocampal;

 As JCs promovem a regulação da excitabilidade hipocampal durante o desenvolvimento pós-natal;

 As JCs compostas por Cx36 apresentam pesos distintos sobre a regulação da atividade espontânea hipocampal de acordo com o período do desenvolvimento pós-natal. Al-Ubaidi MR, White TW, Ripps H, Poras I, Avner P, Gomes D, Bruzzone R. Functional properties, developmental regulation, and chromosomal localization of murine connexin36, a gap-junctional protein expressed preferentially in retina and brain. Journal of neuroscience research. 2000; 59:813-26.

Altman J, Bayer SA. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. The Journal of comparative neurology. 1990; 301:325-42.

Amaral D, Lavenex P. Hippocampal Neuroanatomy. In: Andersen P, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J,Morris RH, [editors] The Hippocampus Book. New York: Oxford University Press; 2007. 3, 37-110.

Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. Neuroscience. 1989; 31:571-91.

Andersen P, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, Morris R. IHistorical perspective: proposed functions, biological characteristics, and neurobiological models of the hippocampus. In: ______ [editors] The hippocampus book. New York: Oxford University Press; 2007. 2, 9-36.

Arumugam H, Liu X, Colombo PJ, Corriveau RA, Belousov AB. NMDA receptors regulate developmental gap junction uncoupling via CREB signaling. Nature neuroscience. 2005; 8:1720-26.

Baldridge D, Lecanda F, Shin CS, Stains J, Civitelli R. Sequence and structure of the mouse connexin45 gene. Bioscience reports. 2001; 21:683-89.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm

Bao X, Chen Y, Reuss L, Altenberg GA. Functional expression in Xenopus oocytes of gap-junctional hemichannels formed by a cysteine-less connexin 43. The Journal of biological chemistry. 2004; 279:9689-92.

Baude A, Bleasdale C, Dalezios Y, Somogyi P, Klausberger T. Immunoreactivity for the GABAA receptor alpha1 subunit, somatostatin and Connexin36 distinguishes axoaxonic, basket, and bistratified interneurons of the rat hippocampus. Cereb Cortex. 2007; 17:2094-107.

Bayer SA. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. The Journal of comparative neurology. 1980a; 190:87-114.

Bayer SA. Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. The Journal of comparative neurology. 1980b; 190:115-34.

Belluardo N, Mudo G, Trovato-Salinaro A, Le Gurun S, Charollais A, Serre-Beinier V, Amato G, Haefliger JA, Meda P, Condorelli DF. Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain. Brain research. 2000; 865:121-38.

Belousov AB, Fontes JD. Neuronal gap junctions: making and breaking connections during development and injury. Trends in neurosciences. 2013; 36:227-36.

Ben-Ari Y. Developing networks play a similar melody. Trends in neurosciences. 2001; 24:353-60.

Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. Nature reviews. Neuroscience. 2002; 3:728-39.

Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. Physiological reviews. 2007; 87:1215-84.

Bischofberger J, Engel D, Li L, Geiger JR, Jonas P. Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. Nature protocols. 2006; 1:2075-81. Blankenship AG, Feller MB. Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. Nature reviews. Neuroscience. 2010; 11:18-29.

Blankenship AG, Hamby AM, Firl A, Vyas S, Maxeiner S, Willecke K, Feller MB. The role of neuronal connexins 36 and 45 in shaping spontaneous firing patterns in the developing retina. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2011; 31:9998-10008.

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

Bonifazi P, Goldin M, Picardo MA, Jorquera I, Cattani A, Bianconi G, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R. GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. Science. 2009; 326:1419-24.

Bukauskas FF, Jordan K, Bukauskiene A, Bennett MV, Lampe PD, Laird DW, Verselis VK. Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000; 97:2556-61.

Bukauskas FF, Verselis VK. Gap junction channel gating. Biochimica et biophysica acta. 2004; 1662:42-60.

Burt JM. Block of intercellular communication: interaction of intracellular H+ and Ca2+. The American journal of physiology. 1987; 253:C607-12.

Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G. The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. Neuron. 2005; 48:591-604.

Chapman RJ, Lall VK, Maxeiner S, Willecke K, Deuchars J, King AE. Localization of neurones expressing the gap junction protein Connexin45 within the adult spinal dorsal horn: a study using Cx45-eGFP reporter mice. Brain structure & function. 2013; 218:751-65.

Cheng A, Tang H, Cai J, Zhu M, Zhang X, Rao M, Mattson MP. Gap junctional communication is required to maintain mouse cortical neural progenitor cells in a proliferative state. Developmental biology. 2004; 272:203-16.

Chevaleyre V, Siegelbaum SA. Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop. Neuron. 2010; 66:560-72.

Cina C, Bechberger JF, Ozog MA, Naus CC. Expression of connexins in embryonic mouse neocortical development. The Journal of comparative neurology. 2007; 504:298-313.

Condorelli DF, Belluardo N, Trovato-Salinaro A, Mudo G. Expression of Cx36 in mammalian neurons. Brain research. Brain research reviews. 2000; 32:72-85.

Condorelli DF, Trovato-Salinaro A, Mudo G, Mirone MB, Belluardo N. Cellular expression of connexins in the rat brain: neuronal localization, effects of kainate-induced seizures and expression in apoptotic neuronal cells. The European journal of neuroscience. 2003; 18:1807-27.

Cook JE, Becker DL. Gap-junction proteins in retinal development: new roles for the "nexus". Physiology (Bethesda). 2009; 24:219-30.

Crepel V, Aronov D, Jorquera I, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R. A parturitionassociated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus. Neuron. 2007; 54:105-20.
Cruikshank SJ, Hopperstad M, Younger M, Connors BW, Spray DC, Srinivas M. Potent block of Cx36 and Cx50 gap junction channels by mefloquine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004; 101:12364-69.

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.

Deguchi Y, Donato F, Galimberti I, Cabuy E, Caroni P. Temporally matched subpopulations of selectively interconnected principal neurons in the hippocampus. Nature neuroscience. 2011; 14:495-504.

Dermietzel R, Traub O, Hwang TK, Beyer E, Bennett MV, Spray DC, Willecke K. Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989; 86:10148-52.

Domenici MR, Berretta N, Cherubini E. Two distinct forms of long-term depression coexist at the mossy fiber-CA3 synapse in the hippocampus during development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998; 95:8310-15.

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

Fink CC, Bayer KU, Myers JW, Ferrell JE, Jr., Schulman H, Meyer T. Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. Neuron. 2003; 39:283-97.

Frotscher M, Seress MFL. Morphological Development oh Hippocampus. In: Andersen P, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J,Morris RH, [editors] The Hippocampus Book. New York: Oxford University Press; 2007. 4, 115-31. Gaiarsa JL, Khalilov I, Gozlan H, Ben-Ari Y. Morphology of CA3 non-pyramidal cells in the developing rat hippocampus. Brain research. Developmental brain research. 2001; 127:157-64.

Galvan CD, Hrachovy RA, Smith KL, Swann JW. Blockade of neuronal activity during hippocampal development produces a chronic focal epilepsy in the rat. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2000; 20:2904-16.

Garaschuk O, Hanse E, Konnerth A. Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. The Journal of physiology. 1998; 507 (Pt 1):219-36.

Giaume C, Leybaert L, Naus CC, Saez JC. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. Frontiers in pharmacology. 2013; 4:88.

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

Hensch TK. Critical period plasticity in local cortical circuits. Nature reviews. Neuroscience. 2005; 6:877-88.

Higa GS, de Sousa E, Walter LT, Kinjo ER, Resende RR, Kihara AH. MicroRNAs in neuronal communication. Molecular neurobiology. 2014; 49:1309-26.

Hill AJ, Jones NA, Williams CM, Stephens GJ, Whalley BJ. Development of multi-electrode array screening for anticonvulsants in acute rat brain slices. Journal of neuroscience methods. 2010; 185:246-56.

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

Huupponen J, Molchanova SM, Lauri SE, Taira T. Ongoing intrinsic synchronous activity is required for the functional maturation of CA3-CA1 glutamatergic synapses. Cerebral cortex. 2013; 23:2754-64.

Iversen. EKIKS. Aprendizagem e memória. In: Manole, editors. Princípios da neurociência. Eric Kandel; James H. Schwartz; Thomas M. Jessel 2003. p. 1227-46.

Jiang JX, Gu S. Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins. Biochim Biophys Acta. 2005; 1711:208-14.

Juszczak GR, Swiergiel AH. Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry. 2009; 33:181-98.

Kandler K, Katz LC. Relationship between dye coupling and spontaneous activity in developing ferret visual cortex. Developmental neuroscience. 1998; 20:59-64.

Khalaf-Nazzal R, Francis F. Hippocampal development - old and new findings. Neuroscience. 2013; 248:225-42.

Kihara AH, de Castro LM, Moriscot AS, Hamassaki DE. Prolonged dark adaptation changes connexin expression in the mouse retina. Journal of neuroscience research. 2006a; 83:1331-41.

Kihara AH, Mantovani de Castro L, Belmonte MA, Yan CY, Moriscot AS, Hamassaki DE. Expression of connexins 36, 43, and 45 during postnatal development of the mouse retina. Journal of neurobiology. 2006b; 66:1397-410. Kihara AH, Santos TO, Osuna-Melo EJ, Paschon V, Vidal KS, Akamine PS, Castro LM, Resende RR, Hamassaki DE, Britto LR. Connexin-mediated communication controls cell proliferation and is essential in retinal histogenesis. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience. 2010; 28:39-52.

Kihara AH, Santos TO, Paschon V, Matos RJ, Britto LR. Lack of photoreceptor signaling alters the expression of specific synaptic proteins in the retina. Neuroscience. 2008; 151:995-1005.

Kinjo ER, Higa GS, de Sousa E, Casado OA, Damico MV, Britto LR, Kihara AH. A possible new mechanism for the control of miRNA expression in neurons. Experimental neurology. 2013; 248:546-58.

Kinjo ER, Higa GS, Morya E, Valle AC, Kihara AH, Britto LR. Reciprocal regulation of epileptiform neuronal oscillations and electrical synapses in the rat hippocampus. PloS one. 2014; 9:e109149.

Kirkby LA, Sack GS, Firl A, Feller MB. A role for correlated spontaneous activity in the assembly of neural circuits. Neuron. 2013; 80:1129-1144.

Kleindienst T, Winnubst J, Roth-Alpermann C, Bonhoeffer T, Lohmann C. Activity-dependent clustering of functional synaptic inputs on developing hippocampal dendrites. Neuron. 2011; 72:1012-24.

Kosaka T, Hama K. Gap junctions between non-pyramidal cell dendrites in the rat hippocampus (CA1 and CA3 regions): a combined Golgi-electron microscopy study. The Journal of comparative neurology. 1985; 231:150-61.

Kunze A, Congreso MR, Hartmann C, Wallraff-Beck A, Huttmann K, Bedner P, Requardt R, Seifert G, Redecker C, Willecke K, Hofmann A, Pfeifer A, Theis M, Steinhauser C. Connexin expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009; 106:11336-41. Kunzelmann P, Blumcke I, Traub O, Dermietzel R, Willecke K. Coexpression of connexin45 and -32 in oligodendrocytes of rat brain. Journal of neurocytology. 1997; 26:17-22.

Lauri SE, Lamsa K, Pavlov I, Riekki R, Johnson BE, Molnar E, Rauvala H, Taira T. Activity blockade increases the number of functional synapses in the hippocampus of newborn rats. Molecular and cellular neurosciences. 2003; 22:107-17.

Lee SM, Tole S, Grove E, McMahon AP. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. Development. 2000; 127:457-67.

Leinekugel X, Khazipov R, Cannon R, Hirase H, Ben-Ari Y, Buzsaki G. Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. Science. 2002; 296:2049-52.

Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R. Ca2+ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. Neuron. 1997; 18:243-55.

Leung DS, Unsicker K, Reuss B. Expression and developmental regulation of gap junction connexins cx26, cx32, cx43 and cx45 in the rat midbrain-floor. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience. 2002; 20:63-75.

Li X, Kamasawa N, Ciolofan C, Olson CO, Lu S, Davidson KG, Yasumura T, Shigemoto R, Rash JE, Nagy JI. Connexin45-containing neuronal gap junctions in rodent retina also contain connexin36 in both apposing hemiplaques, forming bihomotypic gap junctions, with scaffolding contributed by zonula occludens-1. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2008; 28:9769-89.

Li X, Olson C, Lu S, Kamasawa N, Yasumura T, Rash JE, Nagy JI. Neuronal connexin36 association with zonula occludens-1 protein (ZO-1) in mouse brain and interaction with the first PDZ domain of ZO-1. The European journal of neuroscience. 2004; 19:2132-46.

Lohmann C, Finski A, Bonhoeffer T. Local calcium transients regulate the spontaneous motility of dendritic filopodia. Nature neuroscience. 2005; 8:305-12.

MacVicar BA, Dudek FE. Dye-coupling betwen CA3 pyramidal cells in slices of rat hippocampus. Brain research. 1980; 196:494-97.

MacVicar BA, Dudek FE. Electrotonic coupling between granule cells of rat dentate gyrus: physiological and anatomical evidence. Journal of neurophysiology. 1982; 47:579-92.

MacVicar BA, Ropert N, Krnjevic K. Dye-coupling between pyramidal cells of rat hippocampus in vivo. Brain research. 1982; 238:239-44.

Maeda S, Tsukihara T. Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2011; 68:1115-29.

Martin D, Tawadros T, Meylan L, Abderrahmani A, Condorelli DF, Waeber G, Haefliger JA. Critical role of the transcriptional repressor neuron-restrictive silencer factor in the specific control of connexin36 in insulin-producing cell lines. The Journal of biological chemistry. 2003; 278:53082-9.

Maxeiner S, Kruger 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.

Mercer A, Bannister AP, Thomson AM. Electrical coupling between pyramidal cells in adult cortical regions. Brain cell biology. 2006; 35:13-27.

Mohajerani MH, Cherubini E. Role of giant depolarizing potentials in shaping synaptic currents in the developing hippocampus. Critical reviews in neurobiology. 2006; 18:13-23.

Molchanova SM, Huupponen J, Lauri SE, Taira T. Gap junctions between CA3 pyramidal cells contribute to network synchronization in neonatal hippocampus. Neuropharmacology. 2016; 107:9-17.

Montoro RJ, Yuste R. Gap junctions in developing neocortex: a review. Brain research. Brain research reviews. 2004; 47:216-26. Moser MB, Rowland DC, Moser EI. Place cells, grid cells, and memory. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2015; 7:a021808.

Munster-Wandowski A, Gomez-Lira G, Gutierrez R. Mixed neurotransmission in the hippocampal mossy fibers. Frontiers in cellular neuroscience. 2013; 7:210.

Nadarajah B, Jones AM, Evans WH, Parnavelas JG. Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1997; 17:3096-111.

Nagy JI. Evidence for connexin36 localization at hippocampal mossy fiber terminals suggesting mixed chemical/electrical transmission by granule cells. Brain research. 2012; 1487:107-22.

Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. Gap junctions. Comprehensive Physiology. 2012; 2:1981-2035.

Oguro K, Jover T, Tanaka H, Lin Y, Kojima T, Oguro N, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS. Global ischemia-induced increases in the gap junctional proteins connexin 32 (Cx32) and Cx36 in hippocampus and enhanced vulnerability of Cx32 knock-out mice. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2001; 21:7534-42.

Owens DF, Kriegstein AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition? Nature reviews. Neuroscience. 2002; 3:715-27.

Park WM, Wang Y, Park S, Denisova JV, Fontes JD, Belousov AB. Interplay of chemical neurotransmitters regulates developmental increase in electrical synapses. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2011; 31:5909-20.

Paschon V, Higa GS, Resende RR, Britto LR, Kihara AH. Blocking of connexinmediated communication promotes neuroprotection during acute degeneration induced by mechanical trauma. PloS one. 2012; 7:e45449.

Peracchia C. Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. Biochimica et biophysica acta. 2004; 1662:61-80.

Personius KE, Chang Q, Mentis GZ, O'Donovan MJ, Balice-Gordon RJ. Reduced gap junctional coupling leads to uncorrelated motor neuron firing and precocious neuromuscular synapse elimination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007; 104:11808-13.

Pleasure SJ, Anderson S, Hevner R, Bagri A, Marin O, Lowenstein DH, Rubenstein JL. Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. Neuron. 2000; 28:727-40.

Pokorny J, Yamamoto T. Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. I. Development of dendritic arborisation in pyramidal neurons. Brain research bulletin. 1981; 7:113-20.

Rash JE, Davidson KG, Kamasawa N, Yasumura T, Kamasawa M, Zhang C, Michaels R, Restrepo D, Ottersen OP, Olson CO, Nagy JI. Ultrastructural localization of connexins (Cx36, Cx43, Cx45), glutamate receptors and aquaporin-4 in rodent olfactory mucosa, olfactory nerve and olfactory bulb. Journal of neurocytology. 2005; 34:307-41. Redmond L, Kashani AH, Ghosh A. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. Neuron. 2002; 34:999-1010. Roerig B, Feller MB. Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits. Brain research. Brain research reviews. 2000; 32:86-114.

Rombo DM, Newton K, Nissen W, Badurek S, Horn JM, Minichiello L, Jefferys JG, Sebastiao AM, Lamsa KP. Synaptic mechanisms of adenosine A2A receptor-mediated hyperexcitability in the hippocampus. Hippocampus. 2015; 25:566-80.

Rozental R, Srinivas M, Gokhan S, Urban M, Dermietzel R, Kessler JA, Spray DC, Mehler MF. Temporal expression of neuronal connexins during hippocampal ontogeny. Brain research. Brain research reviews. 2000; 32:57-71. Scullin CS, Wilson MC, Partridge LD. Developmental changes in presynaptic Ca(2 +) clearance kinetics and synaptic plasticity in mouse Schaffer collateral terminals. The European journal of neuroscience. 2010; 31:817-26.

Sekino Y, Obata K, Tanifuji M, Mizuno M, Murayama J. Delayed signal propagation via CA2 in rat hippocampal slices revealed by optical recording. Journal of neurophysiology. 1997; 78:1662-68.

Seress L, Ribak CE. The development of GABAergic neurons in the rat hippocampal formation. An immunocytochemical study. Brain research. Developmental brain research. 1988; 44:197-209.

Seress L, Ribak CE. Postnatal development of the light and electron microscopic features of basket cells in the hippocampal dentate gyrus of the rat. Anatomy and embryology. 1990; 181:547-65.

Sipila ST, Huttu K, Soltesz I, Voipio J, Kaila K. Depolarizing GABA acts on intrinsically bursting pyramidal neurons to drive giant depolarizing potentials in the immature hippocampus. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2005; 25:5280-89.

Sipila ST, Huttu K, Voipio J, Kaila K. Intrinsic bursting of immature CA3 pyramidal neurons and consequent giant depolarizing potentials are driven by a persistent Na+ current and terminated by a slow Ca2+ -activated K+ current. The European journal of neuroscience. 2006; 23:2330-38.

Sohl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions. Nature reviews. Neuroscience. 2005; 6:191-200.

Spray DC, Ye ZC, Ransom BR. Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. Glia. 2006; 54:758-73.

Srinivas M, Rozental R, Kojima T, Dermietzel R, Mehler M, Condorelli DF, Kessler JA, Spray DC. Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin36. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1999; 19:9848-55.

Stark C. The functional role of human hippocampus. In: Andersen P, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J,Morris RH, [editors] The Hippocampus Book. New York: Oxford University Press; 2007. 12, 549-79.

Strata F, Atzori M, Molnar M, Ugolini G, Tempia F, Cherubini E. A pacemaker current in dye-coupled hilar interneurons contributes to the generation of giant GABAergic potentials in developing hippocampus. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1997; 17:1435-46.

Swanson LW, Kohler C. Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1986; 6:3010-23.

Tricoire L, Pelkey KA, Erkkila BE, Jeffries BW, Yuan X, McBain CJ. A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2011; 31:10948-70. Tyzio R, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Gozlan H, Aniksztejn L. The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1999; 19:10372-82.

Valiunas V. Biophysical properties of connexin-45 gap junction hemichannels studied in vertebrate cells. The Journal of general physiology. 2002; 119:147-64.

Venance L, Rozov A, Blatow M, Burnashev N, Feldmeyer D, Monyer H. Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000; 97:10260-65.

Wang Y, Belousov AB. Deletion of neuronal gap junction protein connexin 36 impairs hippocampal LTP. Neuroscience letters. 2011; 502:30-32.

Weickert S, Ray A, Zoidl G, Dermietzel R. Expression of neural connexins and pannexin1 in the hippocampus and inferior olive: a quantitative approach. Brain research. Molecular brain research. 2005; 133:102-9.

Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. Biological chemistry. 2002; 383:725-37.

Witter MP, Van Hoesen GW, Amaral DG. Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1989; 9:216-28.

Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW. Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. Nature neuroscience. 2001; 4:151-8.

Zahs KR, Kofuji P, Meier C, Dermietzel R. Connexin immunoreactivity in glial cells of the rat retina. The Journal of comparative neurology. 2003; 455:531-46.

Zeinieh MP, Talhouk RS, El-Sabban ME, Mikati MA. Differential expression of hippocampal connexins after acute hypoxia in the developing brain. Brain & development. 2010; 32:810-17.

Zlomuzica A, Reichinnek S, Maxeiner S, Both M, May E, Worsdorfer P, Draguhn A, Willecke K, Dere E. Deletion of connexin45 in mouse neurons disrupts one-trial object recognition and alters kainate-induced gamma-oscillations in the hippocampus. Physiology & behavior. 2010; 101:245-53.

Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1986; 6:2950-67.

Zsiros V, Maccaferri G. Electrical coupling between interneurons with different excitable properties in the stratum lacunosum-moleculare of the juvenile CA1 rat hippocampus. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2005; 25:8686-95.

OPEN O ACCESS Freely available online

А

PLOS ONE

A New and Reliable Guide for Studies of Neuronal Loss Based on Focal Lesions and Combinations of *In Vivo* and *In Vitro* Approaches

Vera Paschon^{1,2®}, Guilherme Shigueto Vilar Higa^{1,2®}, Lais Takata Walter¹, Érica de Sousa¹, Fausto Colla Cortesão Zuzarte¹, Vivian Roca Schwendler Weber¹, Rodrigo Ribeiro Resende³, Alexandre Hiroaki Kihara^{1,2}*

1 Núcleo de Cognição e Sistemas Complexos, Centro de Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, Santo André, São Paulo, Brasil, 2 Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil, 3 Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Geraís, Belo Horizonte, Minas Geraís, Brasil

Abstract

In this study, we describe a simple and reliable method to study neuroprotective effects in living and organized neural tissue. This method, which was based on retinal explants for *in vivo* focal lesions, was conceived as a collection of modular procedures, which can be customized for particular demands. With this model, it is possible to combine immunohistochemistry with image data analysis to track the two- or three-dimensional redistribution of proteins as a time/space function of primary cell loss. At the same time, it is possible to finely control the exposure of the tissue to specific drugs and molecules. In order to illustrate the use of the proposed method, we tested the effects of two different nanotube compounds on retinal explant viability. Transcriptome analyses can be separately performed in the lesion focus and *penumbra* with laser capture microdissection followed by polymerase chain reaction analyses. In addition, other common experimental drawbacks, such as high individual variance, are eliminated. With intraocular injections, treatments can be verified *in vivo*, with one eye serving as the experimental tissue and the other serving as the control tissue. In summary, we describe a flexible and easy method, which can be useful in combination with a broad variety of recently developed neuroprotective strategies, to study neurodegeneration.

Citation: Paschon V, Higa GSV, Walter LT, Sousa É, Zuzarte FCC, et al. (2013) A New and Reliable Guide for Studies of Neuronal Loss Based on Focal Lesions and Combinations of In Vivo and In Vitro Approaches. PLoS ONE 8(4): e60486. doi:10.1371/journal.pone.0060486

Editor: Stephen D. Ginsberg, Nathan Kline Institute and New York University School of Medicine, United States of America

Received December 17, 2012; Accepted February 26, 2013; Published April 9, 2013

Copyright: © 2013 Paschon et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Federal do ABC (UFABC). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors would like to disclose that corresponding author Alexandre Hiroaki Kihara is a PLOS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: alexandrekihara@gmail.com

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Molecular and cellular therapies that aim to minimize apoptotic effects reveal potential new scenarios for the treatment of neurodegenerative diseases. From nucleic acid aptamers and microRNA (miRNA) antagomirs to the specific delivery controls that are provided by carbon and peptide nanotubes, investigations that use specific concentrations and combinations of molecules and are performed *in vivo* are often comprehensive, particularly considering individual variability. However, neuronal and glial cell cultures offer the convenience of *in vitro* models, but the disruption of the original synaptic networks and the lack of an extracellular matrix environment prevent conclusions about the data from a physiological perspective [1].

When a neurodegenerative process is triggered, several mechanisms result in secondary cell death, including changes in the concentration of extracellular ions, the release of free oxygen radicals, energy depletion, high levels of the excitatory neurotransmitter glutamate, altered intracellular calcium homeostasis,

PLOS ONE | www.plosone.org

and the regulation of gene expression [2,3,4]. Different methods have been proposed to inhibit apoptosis spread, and these could provide efficient strategies for the treatment of stroke, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and other neuronal diseases [5]. Monoclonal antibodies and oligonucleotide therapeutics, such as antisense and small interfering RNA, represent excellent tools for validating targets by functional inactivation of specific protein activity or by knocking out gene expression [6]. New approaches that aim to control unbalanced transcriptomes and/or proteomics, such as nucleic acid aptamers and miRNA antagomirs, have been developed [7,8]. In addition, the efficacy of drug delivery and its combination with nanotechnology, such as carbon and peptide nanotubes, have been extensively studied [9,10].

The retina is a highly organized and easily accessible part of the central nervous system. It has a clear laminar structure and a considerable variety of cell types. Therefore, it is considered a natural brain slice, and an attractive model to study the central nervous system [11]. Moreover, the vitreous chamber acts as a capsule for drug delivery to the retina, permitting experimental

PLOS ONE

Reciprocal Regulation of Epileptiform Neuronal Oscillations and Electrical Synapses in the Rat Hippocampus

Erika R. Kinjo^{1,2}*, Guilherme S. V. Higa^{1,2}, Edgard Morya³, Angela C. Valle⁴, Alexandre H. Kihara^{1,2}*, Luiz R. G. Britto¹

1 Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, 2 Núcleo de Cognição e Sistemas Complexos, Centro de Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brazil, 3 Instituto Internacional de Neurociência de Natal Edmond e Lily Safra, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, 4 Laboratório de Neurociências - LIM 01, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Gap junction (GJ) channels have been recognized as an important mechanism for synchronizing neuronal networks. Herein, we investigated the participation of GJ channels in the pilocarpine-induced status epilepticus (SE) by analyzing electrophysiological activity following the blockade of connexins (Cx)-mediated communication. In addition, we examined the regulation of gene expression, protein levels, phosphorylation profile and distribution of neuronal Cx36, Cx45 and glial Cx43 in the rat hippocampus during the acute and latent periods. Electrophysiological recordings revealed that the GJ blockade anticipates the occurrence of low voltage oscillations and promotes a marked reduction of power in all analyzed frequencies.Cx36 gene expression and protein levels remained stable in acute and latent periods, whereas upregulation of Cx45 gene expression and protein redistribution were detected in the latent period. We also observed upregulation of Cx43 mRNA levels followed by changes in the phosphorylation profile and protein accumulation. Taken together, our results indisputably revealed that GJ communication participates in the epileptiform activity induced by pilocarpine. Moreover, considering that specific Cxs undergo alterations through acute and latent periods, this study indicates that the control of GJ communication may represent a focus in reliable anti-epileptogenic strategies.

Citation: Kinjo ER, Higa GSV, Morya E, Valle AC, Kihara AH, et al. (2014) Reciprocal Regulation of Epileptiform Neuronal Oscillations and Electrical Synapses in the Rat Hippocampus. PLoS ONE 9(10): e109149. doi:10.1371/journal.pone.0109149

Editor: Stéphane Charpier, University Paris 6, France

Received March 25, 2014; Accepted September 1, 2014; Published October 9, 2014

Copyright: © 2014 Kinjo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work was supported by the following funders: FAPESP and CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following conflict: AHK is part of PLOS ONE Academic Board.

* Email: erikareime@gmail.com (ERK); alexandrekihara@gmail.com (AHK)

Introduction

Gap junction (GJ) channels couple adjacent cells, allowing transfer of second messengers, ions, and molecules up to 1 kDa. These channels are composed by a multigene family of integral membrane proteins called connexins (Cx). So far, at least 20 Cx genes were identified in the mouse and human genome [1]. Notably, communication through GJ channels has been recognized as an important mechanism for synchronizing neuronal networks in both physiological and pathological conditions [2–4]. In fact, several evidences from animal models [5–11] and human slices from epileptic patients [12,13] indicate the participation of GJ channels in the generation and maintenance of epileptic seizures. Moreover, specific alterations of Cx expression have been described in tissue from epileptic patients [14–16] and in experimental models [11,17–20].

The aim of this study was to determine the involvement of GJ channels in the epileptiform activity induced by pilocarpine by examining the changes in electrophysiological patterns produced by uncoupling of these channels with carbenoxolone (CBX). After we established the participation of GJ in the ictal discharges, we thoroughly analyzed the regulation of gene expression, changes in

protein levels, phosphorylation profile and distribution of the neuronal Cx36 and Cx45 and the glial Cx43, three of the most highly expressed Cxs in the rat hippocampus, [1,18,21–24] during acute seizures and the epileptogenic process. We observed that pharmacological blockade of GJ channels decreases the epileptiform activity, which in turn regulates Cx gene expression, protein levels and phosphorylation. Thus, our results revealed a reciprocal, mutual regulation of Cx-mediated communication and the epileptiform phenomenon.

Methods

Ethics Statement

All experiments were carried out with healthy male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing between 270 and 300 g and mean age ranging from 80–90 days. Experiments with animals were conducted in accordance with guidelines of the National Institutes of Health (NIH) and the Brazilian Scientific Society for Laboratory Animals. Experimental protocol (#19, page 67, book 02/2009) was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Institute of Biomedical Sciences/University of São Paulo (ICB/USP). All animals were housed in groups of



SCIENTIFIC **Reports**

Received: 09 April 2015 Accepted: 14 January 2016 Published: 12 February 2016

OPEN Pilocarpine-induced seizures trigger differential regulation of microRNA-stability related genes in rat hippocampal neurons

Erika R. Kinjo^{1,*}, Guilherme S. V. Higa^{1,2,*}, Bianca A. Santos¹, Erica de Sousa¹, Marcio V. Damico¹, Lais T. Walter¹, Edgard Morya³, Angela C. Valle⁴, Luiz R. G. Britto² & Alexandre H. Kihara^{1,2}

Epileptogenesis in the temporal lobe elicits regulation of gene expression and protein translation, leading to reorganization of neuronal networks. In this process, miRNAs were described as being regulated in a cell-specific manner, although mechanistics of miRNAs activity are poorly understood. The specificity of miRNAs on their target genes depends on their intracellular concentration, reflecting the balance of biosynthesis and degradation. Herein, we confirmed that pilocarpine application promptly (<30 min) induces status epilepticus (SE) as revealed by changes in rat electrocorticogram particularly in fast-beta range (21–30 Hz). SE simultaneously upregulated XRN2 and downregulated PAPD4 gene expression in the hippocampus, two genes related to miRNA degradation and stability, respectively. Moreover, SE decreased the number of XRN2-positive cells in the hilus, while reduced the number of PAPD4-positive cells in CA1. XRN2 and PAPD4 levels did not change in calretininand CamKII-positive cells, although it was possible to determine that PAPD4, but not XRN2, was upregulated in parvalbumin-positive cells, revealing that SE induction unbalances the accumulation of these functional-opposed proteins in inhibitory interneurons that directly innervate distinct domains of pyramidal cells. Therefore, we were able to disclose a possible mechanism underlying the differential regulation of miRNAs in specific neurons during epileptogenesis.

In the nervous system, control of protein translation by microRNAs (miRNAs) has been recently investigated in distinct situations^{1,2}, including neural development^{5–6}, neurological disorders^{7–9} and adaptation to distinct environmental situations¹⁰⁻¹². miRNAs are short nucleotide sequences (20-24 nt), which post-transcriptionally regulate mRNA copy levels and translation efficiency through complementary binding of small stretches of base pairs, typically in the 3' untranslated region^{13,14}. As previously stated, miRNA/mRNA interactions follow probabilistic rather than deterministic operandi¹⁵.

Therefore, specificity of a particular miRNA depends on its cytosolic concentration. In turn, miRNA copy levels are the result of the balance between biosynthesis and degradation. In spite of detailed mechanisms underlying miRNA biogenesis have been reported^{16–18}, knowledge about molecules related to miRNA stability and degradation is poor and incipient¹⁹. Few recent studies disclosed the involvement of 5'-3' exoribonuclease 2, also known as XRN2, in miRNA degradation, and PAPD4, an atypical poly(A) polymerase, in miRNA stability^{20,21}.

After induction of status epilepticus (SE), changes in neuronal circuits are driven by changes in gene expres-sion and protein translation²²⁻²⁵. The involvement of miRNAs in this process has been extensively investigated²⁶⁻²⁸. Intriguingly, several reports disclosed that regulation of miRNAs populations during epileptogenesis is cell-^{29,30} and region-specific³¹. In spite of all efforts, there are clear gaps about how induction of SE mechanistically affects

¹Núcleo de Cognição e Sistemas Complexos, Centro de Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, SP, Brazil. ²Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. ³Programa de Neuroengenharia, Instituto Internacional de Neurociências Edmond e Lily Safra, ISD, Macaíba, RN, Brazil. 4 Laboratório de Neurociências, LIM 01, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.H.K. (email: alexandrekihara@gmail.com)

PLOS ONE



OPEN ACCESS

Citation: Ikebara JM, Takada SH, Cardoso DS, Dias NMM, de Campos BCV, Bretherick TAS, et al. (2017) Functional Role of Intracellular Calcium Receptor Inositol 1,4,5-Trisphosphate Type 1 in Rat Hippocampus after Neonatal Anoxia. PLoS ONE 12(1): e0169861. doi:10.1371/journal. pone.0169861

Editor: Keiko Abe, The University of Tokyo, JAPAN

Received: October 7, 2016

Accepted: December 22, 2016

Published: January 10, 2017

Copyright: © 2017 Ikebara et al. This is an open access article distributed under the terms of the <u>Creative Commons Attribution License</u>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (URL: http://www.fapesp.br/): 2014/16711-6 AHK -2014/15018-5 JMI - 2014/17434-6 DSC - 2015/ 19657-5 BCVC - 2015/19690- TASB - 2015/ 17044-6 GSVH and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (URL: http://cnpq.br/):- 308608/2014-3 AHK. The funders had no role in study design, data collection and

RESEARCH ARTICLE

Functional Role of Intracellular Calcium Receptor Inositol 1,4,5-Trisphosphate Type 1 in Rat Hippocampus after Neonatal Anoxia

Juliane Midori Ikebara¹, Silvia Honda Takada¹, Débora Sterzeck Cardoso¹, Natália Myuki Moralles Dias¹, Beatriz Crossiol Vicente de Campos¹, Talitha Amanda Sanches Bretherick¹, Guilherme Shigueto Vilar Higa², Mariana Sacrini Ayres Ferraz¹, Alexandre Hiroaki Kihara^{1,2}*

Laboratório de Neurogenética, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brazil,
 Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

* alexandrekihara@gmail.com

Abstract

Anoxia is one of the most prevalent causes of neonatal morbidity and mortality, especially in preterm neonates, constituting an important public health problem due to permanent neurological sequelae observed in patients. Oxygen deprivation triggers a series of simultaneous cascades, culminating in cell death mainly located in more vulnerable metabolic brain regions, such as the hippocampus. In the process of cell death by oxygen deprivation, cytosolic calcium plays crucial roles. Intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP3Rs) are important regulators of cytosolic calcium levels, although the role of these receptors in neonatal anoxia is completely unknown. This study focused on the functional role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 (IP3R1) in rat hippocampus after neonatal anoxia. Quantitative real-time PCR revealed a decrease of IP3R1 gene expression 24 hours after neonatal anoxia. We detected that IP3R1 accumulates specially in CA1, and this spatial pattern did not change after neonatal anoxia. Interestingly, we observed that anoxia triggers translocation of IP3R1 to nucleus in hippocampal cells. We were able to observe that anoxia changes distribution of IP3R1 immunofluorescence signals, as revealed by cluster size analysis. We next examined the role of IP3R1 in the neuronal cell loss triggered by neonatal anoxia. Intrahippocampal injection of non-specific IP3R1 blocker 2-APB clearly reduced the number of Fluoro-Jade C and Tunel positive cells, revealing that activation of IP3R1 increases cell death after neonatal anoxia. Finally, we aimed to disclose mechanistics of IP3R1 in cell death. We were able to determine that blockade of IP3R1 did not reduced the distribution and pixel density of activated caspase 3-positive cells, indicating that the participation of IP3R1 in neuronal cell loss is not related to classical caspase-mediated apoptosis. In summary, this study may contribute to new perspectives in the investigation of neurodegenerative mechanisms triggered by oxygen deprivation.

MicroRNAs in Neuronal Communication

Guilherme Shigueto Vilar Higa · Erica de Sousa · Lais Takata Walter · Erika Reime Kinjo · Rodrigo Ribeiro Resende · Alexandre Hiroaki Kihara

Received: 10 September 2013 / Accepted: 5 December 2013 © Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract MicroRNAs (miRNAs) are short nucleotides sequences that regulate the expression of genes in different eukaryotic cell types. A tremendous amount of knowledge on miRNAs has rapidly accumulated over the last few years, revealing the growing interest in this field of research. On the other hand, clarifying the physiological regulation of gene expression in the central nervous system is important for establishing a reference for comparison to the diseased state. It is well known that the fine tuning of neuronal networks relies on intricate molecular mechanisms, such as the adjustment of the synaptic transmission. As determined by recent studies, regulation of neuronal interactions by miRNAs has critical consequences in the development, adaptation to ambient demands, and degeneration of the nervous system. In contrast, activation of synaptic receptors triggers downstream signaling cascades that generate a vast array of effects, which includes the regulation of novel genes involved in the control of the miRNA life cycle. In this review, we have examined the hot topics on miRNA gene-regulatory activities in the broad field of neuronal communication-related processes. Furthermore, in addition to indicating the newly described effect of

Guilherme Shigueto Vilar Higa, Erica de Sousa, and Lais Takata Walter contributed equally to this work.

G. S. V. Higa · E. de Sousa · L. T. Walter · E. R. Kinjo · A. H. Kihara (🖂)

Núcleo de Cognição e Sistemas Complexos, Centro de Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, Av. Atlântica 420, 09060-000 Santo André, SP, Brazil e-mail: alexandrekihara@gmail.com

G. S. V. Higa · A. H. Kihara

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

R. R. Resende

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológias, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Published online: 03 January 2014

miRNAs on the regulation of specific neurotransmitter systems, we have pointed out how these systems affect the expression, transport, and stability of miRNAs. Moreover, we discuss newly described and under-investigation mechanisms involving the intercellular transfer of miRNAs, aided by exosomes and gap junctions. Thus, in the current review, we were able to highlight recent findings related to miRNAs that indisputably contributed towards the understanding of the nervous system in health and disease.

Kevwords MicroRNA · Synapse · Neuronal communication · Disease · Plasticity · MiRNA · Neurodegeneration

Introduction

The belief that the genome exerts its functions exclusively via classical genes and proteins seems an oversimplification of a complex system of feed-forward and feedback loops that involves several RNA molecules. A large part of the genomic code is only transcribed as RNA and is never translated into protein, and these molecules are collectively identified as noncoding RNA (ncRNAs) [1, 2]. In the last few years, microRNAs (miRNAs), a particular class of ncRNAs, have been studied in a wide variety of cell tissues, including the central nervous system (CNS) [3, 4]. Serving as guides in silencing complexes, miRNAs are short sequences (approximately 21 nucleotides) that direct Argonaute proteins (Ago2) to specific target messenger RNAs by complementary base pairing, causing repression of protein translation [5, 6].

Several families of ncRNAs have been described and implicated in a wide variety of brain functions [7]. In particular, miRNA roles have been described during CNS developmental-related processes [8-10], response to ambient demands [11] and injuries [12, 13], stress or mental disorders

125

Developmental and Functional Expression of miRNA-Stability Related Genes in the Nervous System

Érica de Sousa^{1®}, Lais Takata Walter^{1®}, Guilherme Shigueto Vilar Higa^{1,2®}, Otávio Augusto Nocera Casado¹, Alexandre Hiroaki Kihara^{1,2}*

1 Núcleo de Cognição e Sistemas Complexos, Centro de Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, Santo André, SP, Brasil, 2 Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Abstract

In the nervous system, control of gene expression by microRNAs (miRNAs) has been investigated in fundamental processes, such as development and adaptation to ambient demands. The action of these short nucleotide sequences on specific genes depends on intracellular concentration, which in turn reflects the balance of biosynthesis and degradation. Whereas mechanisms underlying miRNA biogenesis has been investigated in recent studies, little is known about miRNA-stability related proteins. We first detected two genes in the retina that have been associated to miRNA stability, XRN2 and PAPD4. These genes are highly expressed during retinal development, however with distinct subcellular localization. We investigated whether these proteins are regulated during specific phases of the cell cycle. Combined analyses of nuclei position in neuroblastic layer and labeling using anti-cyclin D1 revealed that both proteins do not accumulate in S or M phases of the cell cycle, being poorly expressed in progenitor cells. Indeed, XRN2 and PAPD4 were observed mainly after neuronal differentiation, since low expression was also observed in astrocytes, endothelial and microglial cells. XRN2 and PAPD4 are expressed in a wide variety of neurons, including horizontal, amacrine and ganglion cells. To evaluate the functional role of both genes, we carried out experiments addressed to the retinal adaptation in response to different ambient light conditions. PAPD4 is upregulated after 3 and 24 hours of dark- adaptation, revealing that accumulation of this protein is governed by ambient light levels. Indeed, the fast and functional regulation of PAPD4 was not related to changes in gene expression, disclosing that control of protein levels occurs by post-transcriptional mechanisms. Furthermore, we were able to quantify changes in PAPD4 in specific amacrine cells after dark -adaptation, suggesting for circuitry-related roles in visual perception. In summary, in this study we first described the ontogenesis and functional expression of these two miRNA-stability related proteins in the retina.

Citation: de Sousa É, Walter LT, Higa GSV, Casado OAN, Kihara AH (2013) Developmental and Functional Expression of miRNA-Stability Related Genes in the Nervous System. PLoS ONE 8(5): e56908. doi:10.1371/journal.pone.0056908

Editor: Barbara Bardoni, CNRS UMR7275, France

Received November 6, 2012; Accepted January 15, 2013; Published May 20, 2013

Copyright: © 2013 de Sousa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Universidade Federal do ABC (UFABC). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following conflicts: AHK is an Academic Editor of PLOS ONE. This condition does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: alexandrekihara@gmail.com

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Control of gene expression by microRNAs (miRNAs) in the nervous system has been investigated in distinct situations, such as in development [1,2,3], cell differentiation [4,5] and adaptation to ambient demands [6,7,8]. miRNA comprises a distinct class of 20–24 nucleotide base pair single-stranded noncoding RNA which post-transcriptionally regulates mRNA copy levels and translation efficiency through complementary binding of small stretches of base pairs, typically in the 3' untranslated region [9,10].

The action of these short nucleotide sequences on specific genes depends on intracellular concentration [11], which in turn reflects the balance of biosynthesis and degradation. Whereas mechanisms underlying miRNA biogenesis has been investigated in the last years [12,13], little is known about miRNA-stability and degradation related proteins [14]. In this regard, recent studies disclosed the involvement of 5'-3' exoribonuclease 2, also known as XRN2, in miRNA degradation, and GLD-2 cytoplasmic ribonucleotidyltransferase enzyme, an atypical poly(A) polymerase, aka PAPD4, in miRNA stability [15,16].

Herein, we thoroughly examined the ontogenesis and the presence of these proteins in retinal neurons, progenitor, glial, and endothelial cells. Finally, functional expression of XRN2 and PAPD4 in the retina was assessed after adaptation to different ambient light conditions.

Methods

Ethics Statement

Experiments with animals were conducted in accordance with guidelines of the NIH and the Brazilian Scientific Society for Laboratory Animals. Experimental protocol was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Institute of Biomedical Sciences/University of São Paulo (ICB/USP). All animals were housed in a vivarium with free access to food and water throughout the study.

Experimental Neurology 261 (2014) 510-517



Regular Article

Functional regulation of neuronal nitric oxide synthase expression and activity in the rat retina \Im



Lais Takata Walter^a, Guilherme Shigueto Vilar Higa^{a,b}, Christian Schmeltzer^c, Erica Sousa^a, Erika Reime Kinjo^a, Sten Rüdiger ^c, Dânia Emi Hamassaki ^d, Giselle Cerchiaro ^e, Alexandre Hiroaki Kihara ^{a,b,*}

^a Núcleo de Cognição e Sistemas Complexos, Centro de Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, Brazil

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Braz

^c Institute of Physics, Humboldt University at Berlin, Germany^d Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brazil e Núcleo de Cognição e Sistemas Complexos, Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Braz

ARTICLE INFO

Article history: Received 26 May 2014 Revised 16 July 2014 Accepted 29 July 2014 Available online 6 August 2014

Keywords:

CNS Development Dark-adaptation Visual system Perception Vision Synaptic plasticity Synapse ROS

ABSTRACT

In the nervous system within physiological conditions, nitric oxide (NO) production depends on the activity of nitric oxide synthases (NOSs), and particularly on the expression of the neuronal isoform (nNOS). In the sensory systems, the role of NO is poorly understood. In this study, we identified nNOS-positive cells in the inner nuclear layer (INL) of the rat retina, with distinct characteristics such as somata size, immunolabeling level and location. Employing mathematical cluster analysis, we determined that nNOS amacrine cells are formed by two distinct populations. We next investigated the molecular identity of these cells, which did not show colocalization with calbindin (CB), choline acetyltransferase (ChAT), parvalbumin (PV) or protein kinase C (PKC), and only partial colocalization with calretinin (CR), revealing the accumulation of nNOS in specific amacrine cell populations. To access the functional, circuitry-related roles of these cells, we performed experiments after adaptation to different ambient light conditions. After 24 h of dark-adaptation, we detected a subtle, yet statistically significant decrease in nNOS transcript levels, which returned to steady-state levels after 24 h of normal light-dark cycle, revealing that nNOS expression is governed by ambient light conditions. Employing electron paramagnetic resonance (EPR), we demonstrated that dark-adaptation decreases NO production in the retina. Furthermore, nNOS accumulation changed in the dark-adapted retinas, with a general reduction in the inner plexiform layer. Finally, computational analysis based on clustering techniques revealed that dark-adaptation differently affected both types of nNOS-positive amacrine cells. Taken together, our data disclosed functional regulation of nNOS expression and activity, disclosing new circuitry-related roles of nNOS-positive cells. More importantly, this study indicated unsuspected roles for NO in the sensory systems, particularly related to adaptation to ambient demands.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

As a gaseous, diffusible chemical transmitter, nitric oxide (NO) may interact with intracellular targets to trigger several signal transduction pathways (Benarroch, 2011). Besides classically related to the modulation of neurotransmission and synaptic plasticity (Calabrese et al., 2007), NO seems to play additional roles in the central nervous system (CNS), such as in developmental processes (Contestabile and Ciani, 2004) and in the progression of neurodegenerative diseases (Bonnin et al., 2012; Hall et al., 2012; Virarkar et al., 2013). Indeed, NO is essential for CNS homeostasis, as a product from the conversion of L-arginine to L-citrulline by the members of the NO synthase (NOS) family of proteins (Xu et al., 2004).

In this regard, previous studies determined the expression of neuronal NOS (nNOS) in the retina of several species. In rats, it seems consensual that nNOS accumulates in amacrine cells, although the molecular identity of these cells remains subject to debate (Cellerino et al., 1999; Haverkamp et al., 2000; Kim et al., 1999). Indeed, NO plays several roles in the retina, including regulation of phototransduction and cone glutamate release (Savchenko et al., 1997). In addition, NO inhibits dopamine release (Bugnon et al., 1994) and decreases the intercellular homologous coupling between horizontal cells (Xin and Bloomfield, 2000) and the heterologous coupling between cone bipolar and amacrine AII cells (Mills and Massey, 1995). Furthermore, regulation of nNOS

^{*} Funding: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, #2008)5210-1), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Federal do ABC (UFABC), and DFG (#IRTG1740). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. * Corresponding author at: Núcleo de Cognição e Sistemas Complexos, Centro de

Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, R. São Paulo, s/n — Jardim Antares, 09606-070 São Bernardo do Campo, SP, Brazil.

E-mail address: alexandrekihara@gmail.com (A.H. Kihara)

CrossMark

New Insights on Temporal Lobe Epilepsy Based on Plasticity-Related Network Changes and High-Order Statistics

Erika Reime Kinjo¹ · Pedro Xavier Royero Rodríguez¹ · Bianca Araújo dos Santos¹ · Guilherme Shigueto Vilar Higa^{1,2} · Mariana Sacrini Ayres Ferraz¹ · Christian Schmeltzer^{1,3} · Sten Rüdiger³ · Alexandre Hiroaki Kihara^{1,2}

Received: 16 November 2016 / Accepted: 16 May 2017 © Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Epilepsy is a disorder of the brain characterized by the predisposition to generate recurrent unprovoked seizures, which involves reshaping of neuronal circuitries based on intense neuronal activity. In this review, we first detailed the regulation of plasticity-associated genes, such as ARC, GAP-43, PSD-95, synapsin, and synaptophysin. Indeed, reshaping of neuronal connectivity after the primary, acute epileptogenesis event increases the excitability of the temporal lobe. Herein, we also discussed the heterogeneity of neuronal populations regarding the number of synaptic connections, which in the theoretical field is commonly referred as degree. Employing integrate-and-fire neuronal model, we determined that in addition to increased synaptic strength, degree correlations might play essential and unsuspected roles in the control of network activity. Indeed, assortativity, which can be described as a condition where high-degree correlations are observed, increases the excitability of neural networks. In this review, we summarized recent topics in the field, and data were discussed according to newly developed or unusual tools, as provided by mathematical graph analysis and high-order statistics. With this, we were able to present new foundations for the pathological activity observed in temporal lobe epilepsy.

Alexandre Hiroaki Kihara alexandrekihara@gmail.com

- ² Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
- ³ Institute of Physics, Humboldt University at Berlin, Berlin, Germany

Keywords Epileptogenesis \cdot Status epilepticus \cdot Neuronal plasticity \cdot Assortativity \cdot Degree correlations \cdot Networks \cdot TLE

Temporal Lobe Epilepsy

A widespread view of the development of temporal lobe epilepsy contends that precipitating brain insults like status epilepticus (SE), traumatic brain injury, stroke, infections of the central nervous system, and fever can trigger cascades of molecular and cellular events that permanently enhance excitability in neuronal networks through different mechanisms [1, 2]. These mechanisms include regulation of the expression of a broad spectrum of genes, posttranslational changes of proteins, and alterations of the neuronal circuitries [3–5], both in human tissue and experimental models of epilepsy, which can contribute to a permanent hyperexcitable state, culminating in chronic epilepsy.

While the exact mechanisms that underlie the epileptogenic process are still under debate [6, 7], one of the most substantial hypotheses is that the development of structural changes in the hippocampus has important roles in the establishment of an epileptic circuitry [5, 8-10]. These structural changes, observed both in human tissue and experimental animal models, include a pattern of histopathological changes known as hippocampal sclerosis (HS) [11], characterized by neuronal loss [12] associated with astrogliosis, followed by neuronal network reorganization [13-16]. Given the importance of this pattern of histopathology frequently found in patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy (TLE), the International League Against Epilepsy (ILAE) proposed three types of HS: HS ILAE type 1, the most frequent pattern of HS, characterized by severe neurodegeneration and reactive gliosis in CA1 and CA4, besides neuronal loss in other

¹ Laboratório de Neurogenética, Centro de Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, SP, Brazil

CrossMark

Evaluation of Possible Consequences of Zika Virus Infection in the Developing Nervous System

Lais Takata Walter¹ · Guilherme Shigueto Vilar Higa^{1,2} · Juliane Midori Ikebara¹ · Danila Vedovello³ · Felipe Scassi Salvador⁴ · Silvia Honda Takada¹ · Erika Reime Kinjo¹ · Benjamin J. Whalley⁵ · Márcia Aparecida Sperança³ · Alexandre Hiroaki Kihara^{1,2}

Received: 1 November 2016 / Accepted: 3 February 2017 © Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract The Zika virus (ZIKV) outbreak that occurred in the northeast of Brazil in 2015 led to alarming numbers of babies born with microcephaly in this region. Since then, several studies have evaluated the relationship between ZIKV infection and development of the malformation although the specific mechanistic interaction between ZIKV and human physiological processes that ultimately manifest as microcephaly remains debated. Importantly, most current studies did not consider the specificities of the biology and life cycle of ZIKV. As a consequence, specificities of the infection on the developing central nervous system (CNS) were frequently disregarded. In order to begin to address this important gap in our knowledge, we have collated and critically reviewed the existing evidence in this area to identify any emerging consensus on this topic and thereafter describe possible mechanisms by which ZIKV infection could interfere with specific processes of CNS development, such as neuronal proliferation, and the complex interactions of immature neurons with radial glial cells. With this, we were able to present the current knowledge on this important topic in the neurobiology field.

Alexandre Hiroaki Kihara alexandrekihara@gmail.com

- ¹ Núcleo de Cognição e Sistemas Complexos, Centro de Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, SP, Brazil
- ² Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
- ³ Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, SP, Brazil
- ⁴ Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
- ⁵ School of Chemistry, Food and Nutritional Sciences, and Pharmacy, University of Reading, Whiteknights, Berkshire, Reading, UK

 $\label{eq:constraint} \begin{array}{l} \textbf{Keywords} \ \ Neurodevelopment \ \cdot \ Disease \ \cdot \ Infection \ \cdot \\ Virulence \ \cdot \ Microcephaly \end{array}$

General Aspects of Zika Virus Life Cycle

Zika virus (ZIKV) belongs to the genus *Flavivirus* (family Flaviviridae; derived from flavus = "yellow" in Latin; referring to yellow fever virus) [1], a family that includes around 70 members [2]. Viruses of the Flaviviridae family have received attention from several research groups due to their infection capacity and pathological importance in humans [2–4]. Several representatives of this family are involved in human diseases, such as dengue virus (DENV), yellow fever virus (YFV), west Nile virus (WNV), and Japanese encephalitis virus (JEV) [4]. Viral pathogenicity is probably related to the rapid adaptation of the virus to its hosts through its high genomic mutation rate and lack of repair mechanisms for RNA replication [5].

The genomic structure of ZIKV and its envelope are similar to other *Flavivirus* representatives. ZIKV genomic information is encoded by a positive-sense single-stranded RNA, which implies that the viral RNA has the same coding sense as that of host messenger RNA and can be translated using the same machinery [6–8]. ZIKV genomic RNA is 10,794 bases in length [9], presenting two non-coding regions (5'NCR and 3'NCR). The open frame encodes a polyprotein (5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3') that can be cleaved into different structural proteins: capsid, envelope, membrane precursor, and seven non-structural proteins [4].

The human pathologies caused by *Flavivirus* can be generically grouped into encephalitis and hemorrhagic diseases, although the molecular pathogenesis of *Flavivirus* infection is not completely known. It is currently understood that, following inoculation from the bite of an infected mosquito, Experimental Neurology 248 (2013) 546-558



A possible new mechanism for the control of miRNA expression in neurons $\overset{\bigstar}{\succ}$



Erika Reime Kinjo ^{a,1}, Guilherme Shigueto Vilar Higa ^{a,b,1}, Erica de Sousa ^a, Otávio Augusto Nocera Casado ^a, Marcio Vinicius Damico ^a, Luiz Roberto G. Britto ^b, Alexandre Hiroaki Kihara ^{a,b,*}

^a Núcleo de Cognição e Sistemas Complexos, Centro de Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, 09210-580 Santo André, SP, Brazil
^b Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history: Received 28 May 2013 Revised 15 July 2013 Accepted 28 July 2013 Available online 7 August 2013

ABSTRACT

The control of gene expression by miRNAs has been widely investigated in different species and cell types. Following a probabilistic rather than a deterministic regimen, the action of these short nucleotide sequences on specific genes depends on intracellular concentration, which in turn reflects the balance between biosynthesis and degradation. Recent studies have described the involvement of XRN2, an exoribonuclease, in miRNA degradation and PAPD4, an atypical poly(A) polymerase, in miRNA stability. Herein, we examined the expression of XRN2 and PAPD4 in developing and adult rat hippocampi. Combining bioinformatics and real-time PCR, we demonstrated that XRN2 and PAPD4 expression is regulated by the uncorrelated action of transcription factors, resulting in distinct gene expression profiles during development. Analyses of nuclei position and nestin labeling revealed that both proteins progressively accumulated during neuronal differentiation, and that they are weakly expressed in immature neurons and absent in glial and endothelial cells. Despite the differences in subcellular localization, both genes were concurrently identified within identical neuronal subpopulations, including specific inhibitory interneurons. Thus, we cope with a singular circumstance in biology: an almost complete intersected expression of functional-opposed genes, reinforcing that their antagonistically driven actions on miRNAs "make sense" if simultaneously present at the same cells. Considering that the transcriptome in the nervous system is finely tuned to physiological processes, it was remarkable that miRNA stability-related genes were concurrently identified in neurons that play essential roles in cognitive functions such as memory and learning. In summary, this study reveals a possible new mechanism for the control of miRNA expression.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

MicroRNAs (miRNAs), endogenous single-stranded RNA approximately 21 nucleotides in length are fundamental post-transcriptional regulators of gene expression (Ambros and Lee, 2004; Brennecke et al., 2005; He and Hannon, 2004). Regulation of gene expression by miRNAs is highly conserved among species, and has been studied in a wide variety of processes and cell types (Matzke and Matzke, 2004).

In the nervous system, the role of miRNAs has also been investigated in fundamental processes such as development (Decembrini et al., 2009; Gao, 2008; Li et al., 2011; Sanuki et al., 2011; Somel et al., 2011), cell differentiation (Andersson et al., 2010; Zheng et al., 2010), adaptation to ambient demands (Bredy et al., 2011; Konopka et al.,

09060-000, Santo André, SP, Brazil. *E-mail address:* alexandrekihara@gmail.com (A.H. Kihara). 2011; Krol et al., 2010), neurodegeneration, and other disorders (Eacker et al., 2009; Harraz et al., 2012; Xu et al., 2013). During hippocampal formation, changes in miRNA expression govern synaptic plasticity (Cohen et al., 2011; Lee et al., 2012) such as memory and learning (Konopka et al., 2011; Wang et al., 2012). Following a probabilistic rather than deterministic operandi (Ragan et al., 2011), miRNA specificity depends on its cytosolic concentration, which in turn is the result of the balance between biosynthesis and degradation. While mechanisms underlying miRNA synthesis have been exhaustively investigated (Diederichs and Haber, 2007; Koscianska et al., 2011; Wu et al., 2012), little is known about proteins involved in miRNA stability and degradation (Bail et al., 2010). Recent studies have described the involvement of XRN2, a 5' \rightarrow 3' exoribonuclease, in miRNA degradation and PAPD4, an atypical poly(A) polymerase also known as GLD-2, in miRNA stability (Kai and Pasquinelli, 2010; Katoh et al., 2009).

In this study, we thoroughly examined the ontogenesis of XRN2 and PAPD4 in hippocampal neurons, progenitor, glial, and endothelial cells using a combination of different methods and analyses. Studies employing hippocampal formation include several advantages such as a constant cell proliferation state, synaptic plasticity, and neuronal diversity in well-characterized neuronal circuits. We demonstrate that

^{1/c} Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.
* Corresponding author at: Núcleo de Cognição e Sistemas Complexos, Centro de Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, Av. Atlântica 420,

¹ These authors contributed equally to this work.

^{0014-4886/\$ -} see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.07.022

Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2015, Article ID 162876, 11 pages http://dx.doi.org/10.1155/2015/162876



Research Article

Copper Uptake in Mammary Epithelial Cells Activates Cyclins and Triggers Antioxidant Response

Nathália Villa dos Santos,¹ Andreza Cândido Matias,¹ Guilherme Shigueto Vilar Higa,² Alexandre Hiroaki Kihara,² and Giselle Cerchiaro¹

¹Center for Natural Sciences and Humanities, Federal University of ABC (UFABC), 09210-170 Santo André, SP, Brazil ²Center for Mathematics, Computation and Cognition, Federal University of ABC (UFABC), 09210-170 Santo André, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Giselle Cerchiaro; giselle.cerchiaro@ufabc.edu.br

Received 10 March 2015; Accepted 14 June 2015

Academic Editor: Joseph A. Adeyemi

Copyright © 2015 Nathália Villa dos Santos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The toxicologic effects of copper (Cu) on tumor cells have been studied during the past decades, and it is suggested that Cu ion may trigger antiproliferative effects *in vitro*. However, in normal cells the toxicologic effects of high exposures of free Cu are not well understood. In this work, Cu uptake, the expression of genes associated with cell cycle regulation, and the levels of ROS production and related oxidative processes were evaluated in Cu-treated mammary epithelial MCF10A nontumoral cells. We have shown that the Cu additive is associated with the activation of cyclin D1 and cyclin B1, as well as cyclin-dependent kinase 2 (CDK2). These nontumor cells respond to Cu-induced changes in the oxidative balance by increase of the levels of reduced intracellular glutathione (GSH), decrease of reactive oxygen species (ROS) generation, and accumulation during progression of the cell cycle, thus preventing the cell abnormal proliferation or death. Taken together, our findings revealed an effect that contributes to prevent a possible damage of normal cells exposed to chemotherapeutic effects of drugs containing the Cu ion.

1. Introduction

Recent advances in biochemical tools have highlighted the extraordinary array of functions of Cu in living organisms [1]. Cu is required for binding to the dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 *MEK1* and promotion of mitogen-activated protein kinase *MAPK* signaling and tumorigenesis by v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B *BRAF* in mammary tumors [2]. However, despite the enormous expansion in our knowledge of Cu biology that has occurred over the last decades, we are only just beginning to unravel the complexity of the role of this transition metal in the regulation of cellular processes and cell cycle.

Cu is an essential trace element and its intracellular concentrations are tightly controlled. Within the cell, Cu is distributed by metallochaperones and plays a fundamental role in regulating cell growth, altering gene expression (due to oxidation of guanosine and adenosine residues in nucleic acids or changes in transcription factor/growth factor activities) [3]. A critical factor in the development of cancer is angiogenesis, which endows continuous supplying of nutrients, growth factors, and signaling agents to malignant tissue [4-7]. This angiogenic response in tumor is stimulated by ceruloplasmin, the plasma Cu-carrier [6, 8, 9]. Although these studies with cancer cells and tumors strongly suggested that Cu plays an essential role in cell growth and proliferation, little is known about underlying molecular mechanisms. Also, Cu is involved in redox reactions that generate intracellular reactive oxygen species (ROS), mainly by Fenton reaction, and a number of reports point to a relationship between Cu, ROS production, and cancer development [10, 11], and recently the role of Cu metabolism in resistance of cancer cells to cisplatin [12-14]. The redox status of cells is influenced by the homeostasis of reactive species, since ROS might act as secondary messengers in the regulation of pathways associated with cell proliferation, differentiation, and apoptosis [15, 16]. Based on these findings, some studies suggested that elevated Cu levels and increased oxidative stress may be used in selective cancer therapy [17, 18]; however, the effect of Cu-stimulation in cell proliferation

CAPÍTULO

MATRIZES MULTIELETRODO: APLICAÇÕES EM BIOTECNOLOGIA

Guilherme Shigueto Vilar Higa Erika Reime Kinjo Pedro Xavier Royero Rodríguez Mauro Cunha Xavier Pinto Rodrigo R. Resende Alexandre Hiroaki Kihara

5.1 INTRODUÇÃO

L

Em praticamente todas as células eucarióticas são encontradas diferenças de cargas elétricas entre as faces de suas membranas, sejam estas delimitadoras de organelas como a mitocôndria, seja a própria membrana celular. A diferença de potencial elétrico, também conhecida como potencial de membrana, geralmente apresenta valor negativo na face interna em relação à face externa, tipicamente apresenta entre –30 e –90 mV. Esta capacidade da membrana citoplasmática, também conhecida como plasmalema, tem algumas consequências. Primeiro, permite que uma célula acumule energia potencial através da polarização de cargas funcionando como uma pilha ou bateria, fornecendo energia ao se despolarizar. Além disso, em células em que a dinâmica desta perda de polarização segue regime não linear, podem ocorrer amplificação e propagação da despolarização, processos mediados