Guilherme Shiguetto 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

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 pós-natal. 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 ≥ 23 Hz 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 ≥ 23 Hz. 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 ≥ 23 Hz, 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 CaMKII α , 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 ($\geq 23\text{Hz}$) 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 ($\geq 23\text{Hz}$). 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 ($\geq 23\text{Hz}$) 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.

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/explicita, 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 gliopitélio fimbrial (*fimbrial gliopithelium*), 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 CA1b,c (E18-E19), da mesma forma que neurônios piramidais de CA3a,b são originados 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 (curva de CA3). O tipo neuronal, a rota de migração e o destino onde os 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 recém-formadas 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 hipocâmpais diferem em termos de procedência e em período de gênese dos neurônios principais do CA e GD. Os interneurônios hipocâmpais 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 cells*, *ivy cells*, *bistratified*, *O-L cells*, interneurônios axo-axonais e 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 depolarizant 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 γ -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 (Cl⁻). 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. A 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 eventos por segundo, sendo determinada por um lento 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 formas de atividade espontânea na região CA1 durante o desenvolvimento embrionário e primeiros dias do período pós-natal. (A1) imagens de cálcio providas 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 μ M. (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: $\sim$ -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, conseqüentemente, 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 heterotípicos, respectivamente. Da mesma forma, os hemicanais podem ser constituídos por conexinas distintas ou homólogas, classificadas como homoméricas ou heteroméricas. (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 , δ e ϵ). 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 GJ α 1, 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, Baldrige 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 metabólitos 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 pós-natal 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.

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 hipocampus 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.

REFERÊNCIAS*

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. Historical 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.

Baldrige 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.html

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 parturition-associated 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 of 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, Riekkari 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 between 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 connexin-mediated 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.