ERIKA REIME KINJO

CONEXINAS NA EPILEPSIA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR PILOCARPINA: ABORDAGEM MOLECULAR E ELETROFISIOLÓGICA

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

ERIKA REIME KINJO

CONEXINAS NA EPILEPSIA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR PILOCARPINA: ABORDAGEM MOLECULAR E ELETROFISIOLÓGICA

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

Área de Concentração: Fisiologia

Humana

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto

Giorgetti de Britto

Versão original.

São Paulo

2011

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

reprodução não autorizada pelo autor

Kinjo, Erika Reime.

Conexinas na epilepsia experimental induzida por pilocarpina: abordagem molecular e eletrofisiológica. / Erika Reime Kinjo. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Luiz Roberto Giorgetti de Britto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Comunicação celular no sistema nervoso.

Versão do título para o inglês: Connexins in the experimental epilepsy induced by pilocarpine: molecular and electrophysiological approach.

Descritores: 1. Epilepsia do lobo temporal 2. Conexinas 3. Hipocampo 4. Eletrofisiologia 5. Pilocarpina 6. Carbenoxolona I. Britto, Luiz Roberto Giorgetti de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0178/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Erika Reime Kinjo.
Título da Tese:	Conexinas na epilepsia experimental induzida por pilocarpina: abordagem molecular e eletrofisiológica.
Orientador(a):	Luiz Roberto Giorgetti de Britto.
	ulgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão ca realizada a, considerou () Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Nome completo: Instituição:
Examinador(a):	Nome completo: Instituição:
Examinador(a):	Nome completo:
Examinador(a):	Nome completo:
Presidente:	Nome completo:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 19 nas fls. 67 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Luiz Roberto G Britto, Coordenador(a) da Linha de pesquisa Expressão de conexinas no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina do qual participou(aram) o(s) alunos Érika Reime Kinjo e o pesquisador Alexandre Kihara, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em 20.02.09, com validade de 3 anos.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2009.

Prof.Dr.Wothan Tavares de Lima Coordenador CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA Secretária-Suplente CEEA – ICB/USP

Aos meus país Híde e Mieko, aos meus irmãos Sayuri, Renan, Cintia e Aline, e ao Willian, pelos momentos alegres, amor, ensinamentos, incentívo, apoio...
vocês são indispensáveis na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Britto, por ter me aceito em seu laboratório, permitindo que eu trilhasse meu caminho. Agradeço por estar sempre presente, pelo apoio constante, paciência, ensinamentos e inestimável amizade. Você é um exemplo a ser seguido. Tenho muito orgulho de ter sido sua aluna. Muito obrigada, de coração.

Ao Prof. Alexandre Kihara, por ter me apoiado durante todo o meu doutorado, pelas valiosas discussões, conselhos, amizade e por estar sempre disposto a ajudar, estimulando-me com suas ideias.

À Prof^a. Angela, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, paciência, valiosos ensinamentos e tempo dedicado ao meu trabalho. Agradeço pelo constante incentivo e por ter se tornado uma pessoa tão querida.

À Prof^a Andréa, por ser sempre tão atenciosa e por nos acalmar quando bate o desespero!

Ao Edgard Morya, pela inestimável ajuda nas análises dos eletrocorticogramas.

Aos membros da minha banca de qualificação, Professores Ribeiro, Angela e Flávia, pelas valiosas sugestões.

Ao Adilson, com seu jeito maluco de ser, pela inestimável ajuda, por ser sempre prestativo e, principalmente, por ser um grande amigo, com quem sempre posso contar.

Ao Guilherme, pela valiosa ajuda nos experimentos de PCR, discussões e amizade.

Agradeço a todos os meus queridos amigos dos laboratórios do Prof. Britto e da Profª Andréa. Vocês foram muito importantes para a minha jornada... Ana (Cabeção) e Taisa (Tatá), pelas inúmeras conversas, desabafos, risadas e por serem amigas tão especiais; Carol Real, com seu ritmo frenético, sempre disposta a ajudar a todos; Cecília, eterna "palhaça", sempre nos fazendo rir de suas brincadeiras; Vivian, sempre bem-humorada e com ótima prosa; Marina (cujo apelido não posso citar...), por seu jeito sereno e tranquilizador; Gabi, que sempre encontra uma maneira de me provocar!; Kallene, nossa médica de plantão, com seu jeito dramático de ser; Mauro (tranqueira), com seus comentários hilários; Caio, com seu jeito tímido e ao mesmo tempo divertido; Juju (ou Angélica...), sempre atenciosa; Raquel, sempre de bem com a vida e bem-humorada; Luciana, pelas ótimas conversas...

Aos amigos que passaram pelo laboratório e que serão sempre lembrados com carinho... Rafaela, pelo seu jeito extrovertido, ótima convivência e trabalho em equipe, e pela amizade; Maru, por ter me ensinado a fazer arroz (!) durante o período em que moramos juntas e

pelos conselhos, conversas...; Rô, pelo seu jeito divertido, sempre nos ajudando; Rodrigo (tranqueira), por ter me indicado ao Prof^o Britto, pela amizade e paciência na época do IQ; Daniel, sempre pronto para nos socorrer com um sorriso no rosto; Rhowena, por ter me ajudado inúmeras vezes no início da minha jornada; Verinha, com seu jeito espontâneo e otimista; Milena, sempre de bem com a vida... agradeço também ao Samuel, Renata, Carol Alencar, Paula, Carol Margonato, Carina (Caquinha), Danielle...

Às amigas Iara, Flávia, Alice, Gabi, Thalma, Fernanda e Gabi Matos, por estarem sempre presentes, me ajudando no que for necessário, e pela valiosa amizade.

Aos amigos do laboratório da Prof^a Angela, Gisele, Eduardo e Ana Maria, agradeço pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar; Rafael, Amabili e Fernanda, pela ótima convivência.

Ao Profo Isaltino Marcelo Conceição, por ter despertado em mim o interesse pela pesquisa.

Aos funcionários do ICB, Zé Maria, Paloma, Renaide, Marcelo, Vilson, Miguel, Maria, Jaqueline, Claudio, Teresa, Eva...

Aos meus pequenos sobrinhos/afilhados, Mei, Pedro, Kenzo e Alice, por fazerem minha vida muito mais alegre e divertida, de um jeito que só vocês sabem fazer!!

Aos meus irmãos, por todos os momentos que passamos juntos e por estarem sempre presentes.

Aos meus pais, por terem proporcionado todas as condições para que eu pudesse chegar até aqui. Vocês são responsáveis pela transmissão de todos os valores que tenho. Obrigada pelo amor, ensinamentos, apoio, broncas, conversas... enfim, por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim. Espero um dia poder retribuir.

Ao Willian, companheiro de todas as horas, verdadeiro incentivador. Obrigada por me fazer acreditar que tudo daria certo, por me acalmar nos momentos de desespero, pelo apoio constante, amor, paciência e por fazer parte da minha vida.

Agradeço a Deus, por ter colocado todas essas pessoas no meu caminho.

À FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 EPILEPSIA	15
1.1.1 Epilepsia do lobo temporal	16
1.1.2 Modelo experimental de ELT induzido por pilocarpina	19
1.1.3 Formação hipocampal	21
1.1.3.1 Anatomia da formação hipocampal	23
1.2 CANAIS DE JUNÇÕES COMUNICANTES	28
1.2.1 Canais de JC e epilepsia	32
2 OBJETIVOS	36
2.1 GERAIS	37
2.2 ESPECÍFICOS	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 INDUÇÃO DO SE	39
3.2 IMMUNOBLOTTING	40
3.3 PCR EM TEMPO REAL	41
3.4 EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS DO BLOQUEIO DE O	CANAIS DE
JC	44
3.4.1 Implante de eletrodos	44
3.4.2 Registros eletrocorticográficos	47

3.4.3 Indução do SE e tratamento com carbenoxolona (CBX)	8
3.4.4 Análise visual e instrumental dos eletrocorticogramas 5	1
3.4.5 Análise espectral	1
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	4
4 RESULTADOS	5
4.1 SE – RESULTADO COMPORTAMENTAL	6
4.2 IMMUNOBLOTTING 5	6
4.3 PCR EM TEMPO REAL 6	4
4.4 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA DA ATIVIDADE EPILEPTIFORME	=
- EFEITOS DA CBX SOBRE O SE INDUZIDO POR PILOCARPINA 6	7
4.4.1 Observação de comportamentos 6	8
4.4.1 Observação de comportamentos 6 4.4.2 Análise dos eletroscilogramas 6	
	8
4.4.2 Análise dos eletroscilogramas 6	8
4.4.2 Análise dos eletroscilogramas	8 4 5
4.4.2 Análise dos eletroscilogramas 6 5 DISCUSSÃO 8 5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE Cx43 8	8 4 5 2
4.4.2 Análise dos eletroscilogramas 6 5 DISCUSSÃO 8 5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE Cx43 8 5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE Cx36 9	8 4 5 2 <u>=</u>
4.4.2 Análise dos eletroscilogramas 6 5 DISCUSSÃO 8 5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE Cx43 8 5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE Cx36 9 5.3 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA DA ATIVIDADE EPILEPTIFORME	8 4 5 2 = 5

RESUMO

Kinjo ER. Conexinas na epilepsia experimental induzida por pilocarpina: abordagem molecular e eletrofisiológica. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Os canais de junções comunicantes (CJC) são contatos intercelulares que podem estar envolvidos com a geração e a generalização de crises epilépticas, e alterações na expressão de conexinas (Cx) têm sido descritas tanto em modelos animais de epilepsia como em pacientes. Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão hipocampal de proteínas (por meio de ensaios de immunoblotting) e de RNAs mensageiros (PCR em tempo real) das Cx43 e Cx36 (proteínas que compõem os CJC de astrócitos e neurônios, respectivamente) nos períodos agudo, latente e crônico do modelo de epilepsia do lobo temporal (ELT) induzido por pilocarpina. Além disso, os efeitos de um bloqueador de canais de junções comunicantes, a carbenoxolona (CBX), foram avaliados por meio de análise eletrofisiológica durante o período de status epilepticus. Os resultados referentes à Cx43 demonstram redução dos níveis proteicos no período latente (p<0,05) e aumento no período crônico do modelo (p<0,01), enquanto os níveis de RNAm de Cx43 não sofreram alteração em nenhum dos períodos avaliados. Em relação à Cx36, tanto os níveis proteicos quanto os de RNAm não sofreram alterações em nenhum dos períodos avaliados. Os dados obtidos a partir do bloqueio de CJC mostraram redução do tempo para diminuição da potência na banda de frequência entre 15 e 30 Hz, oscilação que tem grande contribuição na composição do sinal durante atividade epileptiforme, além de redução da amplitude relativa dos potenciais epileptiformes induzidos por pilocarpina. Foi observado ainda que o grupo tratado com CBX passou a apresentar períodos flat antecipadamente, em relação aos animais tratados com salina ao invés de CBX. Os dados deste estudo sugerem um importante papel dos CJC na ELT induzida por pilocarpina, contribuindo para o conhecimento da regulação destes canais na epilepsia experimental, como subsídio para futuras possíveis intervenções no processo de gênese da ELT.

Palavras-chave: Epilepsia. Pilocarpina. Hipocampo. Canais de junções comunicantes. Conexinas. Carbenoxolona. Eletrofisiologia.

ABSTRACT

Kinjo ER. Connexins in the experimental epilepsy induced by pilocarpine: molecular and electrophysiological approach. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Communication through gap junction (GJ) channels is increasingly recognized as an important mechanism for synchronizing neuronal networks under physiological and pathological conditions. A number of studies have also established that epilepsy is associated with changes in the connexins (Cxs, the proteins that compose GJ). In the present study, the hippocampal protein and mRNA levels of Cx43 and Cx36 (proteins that compose GJ channels of astrocytes and neurons, respectively) were investigated in the acute, latent and chronic periods of the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy (TLE) using immunoblotting and real-time PCR assays. In addition, the effects of a GJ blocker (carbenoxolone - CBX) on pilocarpine-induced status epilepticus (SE) in rats were also evaluated by electrophysiological recordings. Our results on Cx43 showed reduction of the protein levels in the latent period (p<0.05) and increase in the chronic period of the pilocarpine model (p<0.01), whereas no changes were observed in the mRNA levels of Cx43 at all studied periods. In relation to Cx36, both protein and mRNA levels showed no changes in any of the evaluated periods. The electrophysiological recordings indicated that rats presenting SE and treated with CBX displayed a marked reduction of power in the 15-30Hz frequency, which contains dynamic power in the EEG during SE. Decrease in the amplitude of the epileptiform potentials induced by pilocarpine was also seen, in addition to anticipation of occurrence of flat periods in the group treated with CBX compared to those treated with saline. Data obtained from this study suggest an important role for GJ channels in the pilocarpineinduced TLE, contributing to greater understanding of the regulation of these channels in the experimental epilepsy. These data may also represent a subsidy for possible future interventions in the process of genesis of TLE.

Key-words: Epilepsy. Pilocarpine. Hippocampus. Gap junction channels. Connexins. Carbenoxolone. Electrophysiology.

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPILEPSIA

De acordo com a Liga Internacional contra Epilepsia (ILAE – do inglês International League Against Epilepsy), a epilepsia é um distúrbio da função cerebral caracterizado pela predisposição à geração de crises epilépticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais dessa condição, sendo que a definição de epilepsia requer a ocorrência de ao menos uma crise epiléptica. As crises epilépticas, por sua vez, são definidas como sinais e/ou sintomas transitórios decorrentes da atividade neuronal excessiva ou sincronizada no encéfalo (Fisher et al., 2005).

Estima-se que a prevalência das epilepsias seja entre 4/1000 e 10/1000 habitantes, sendo que aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo são portadoras de epilepsia (Organização Mundial da Saúde, 2011). Um estudo realizado por Noronha et al. (2007) demonstrou que a prevalência das epilepsias no Brasil é de 5,4/1000 habitantes.

A classificação das epilepsias ainda é alvo de muitos estudos e gera controvérsias. Nesse sentido, a ILAE revisou a terminologia e os conceitos para organização de crises epilépticas e epilepsias (Berg et al., 2010). De acordo com esse documento, as epilepsias podem ser classificadas em genética, estrutural/metabólica e de causa desconhecida, sendo que esses termos substituíram as terminologias idiopática, sintomática e criptogênica, respectivamente. Os termos generalizada e focal não são mais usados para classificar as epilepsias, mas características como evolução natural da doença, idade de início, e outras como resposta aos fármacos, padrão dos registros

ictais e pós-ictais e achados estruturais de neuroimagem também auxiliam na classificação da síndrome epiléptica em questão.

As crises epilépticas, por sua vez, podem ser classificadas de acordo com a maneira pela qual elas têm início, ou seja, crises generalizadas ou focais. As crises generalizadas têm início em alguma região do encéfalo e rapidamente envolvem redes distribuídas bilateralmente. Tais redes podem incluir estruturas corticais e subcorticais, mas não necessariamente envolvem todo o córtex. Já as crises focais têm início dentro de redes limitadas a um hemisfério. Sua localização pode ser discreta ou mais amplamente distribuída, originando-se em estruturas subcorticais (Berg et al., 2010). Ainda em relação à classificação de crises epilépticas, outras terminologias amplamente utilizadas e que o novo documento considera imprecisas, e, portanto foram eliminadas, são os termos simples e complexa, que eram termos utilizados para caracterizar as crises focais de acordo com o prejuízo da consciência (complexas) ou sua preservação (simples). No entanto, a recomendação é de que as crises focais sejam descritas de acordo com o propósito específico a que se destina (diagnóstico diferencial, triagem para cirurgias, dentre outras), podendo ser úteis dados como preservação ou não da consciência, outras características cognitivas, localização e progressão dos eventos ictais.

1.1.1 Epilepsia do lobo temporal

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum das anteriormente denominadas epilepsias focais, representando cerca de 40% de todos os casos (Duncan, 2006; Guedes et al., 2006). Por apresentar alta

refratariedade ao tratamento farmacológico e alta prevalência, é de grande importância clínica e por esses motivos é um dos tipos de epilepsia mais estudados (Engel et al., 1993; Sloviter, 2005).

A ELT pode ser subdividida em mesial, neocortical ou lateral, de acordo com a origem e a semiologia das crises, sendo que a epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) corresponde a aproximadamente 60% dos casos de ELT (Engel e Shields, 1997).

Na ELTM, o foco epiléptico localiza-se sistema límbico, no principalmente hipocampo, córtex entorrinal, amígdala no giro parahipocampal (Bartolomei et al., 2005; Guedes et al., 2006). Na maioria das vezes, a ELTM tem seu início na infância tardia ou adolescência, e geralmente há história prévia de convulsão febril, hipóxia, trauma crânio-encefálico ou infecções do sistema nervoso central (SNC) (French et al., 1993; Guedes et al., 2006).

Na maioria dos pacientes com ELTM, a semiologia ictal consiste em uma aura (geralmente sensações epigástricas, fenômenos físicos e experienciais e alterações afetivas) seguida por olhar fixo não responsivo e automatismos oroalimentares. Após a crise geralmente há um período de confusão, e afasia pós-ictal pode ser observada se as crises acometem o lobo temporal dominante (Pedley, 1996).

A maioria dos pacientes com ELT pode ter alterações de memória e algum tipo de comprometimento das funções verbais ou vísuo-espaciais, dependendo se o lobo temporal epileptogênico é o dominante ou o não dominante. Alguns autores acreditam que distúrbios de humor e certos traços de personalidade, incluindo emotividade, dependência e passividade,

hipossexualidade, religiosidade, são mais prevalentes em pacientes com ELT, mas isto ainda gera controvérisas (Pedley, 1996).

O achado patológico mais encontrado em espécimes removidos de pacientes com ELTM resistentes ao tratamento farmacológico é a esclerose hipocampal (Babb et al., 1984^a; Thom et al., 2005; Guedes et al., 2006; Blümcke, 2009). Este padrão de lesão é caracterizado por perda de células piramidais das regiões CA1, CA3 e hilo do giro denteado. As células da região CA2 e as células granulares do giro denteado são caracteristicamente menos afetadas (Babb et al., 1984^b; Blümcke, 2009), porém ocorre uma dispersão das células granulares, que poderia levar a alterações na conectividade dessas células, contribuindo para a atividade epiléptica (Houser, 1990).

Além da perda neuronal seletiva, que invariavelmente está associada à intensa gliose reativa, observa-se também nesses tecidos reorganização axonal, caracterizada por brotamentos de axônios das células granulares (fibras musgosas) na região da camada molecular interna do giro denteado (Tauck e Nadler, 1985; Sutula et al., 1988; Mello et al., 1993). Há estudos que sugerem que o brotamento das fibras musgosas forma um circuito hipocampal monossináptico excitatório, o qual seria responsável pela geração e recorrência das crises epilépticas (Tauck e Nadler, 1985; Buckmaster e Dudek, 1999; Lynch e Sutula, 2000). Por outro lado, há dados que sugerem que o brotamento das fibras musgosas não é uma condição essencial para a geração das crises espontâneas recorrentes, uma vez que o bloqueio do brotamento por cicloexamida (inibidor de síntese proteica) não afeta o aparecimento de crises espontâneas e recorrentes nos modelos de *status epilepticus* (SE) induzidos por pilocarpina e ácido caínico (Longo e Mello, 1997, 1998). Além

disso, um trabalho realizado por Zhang et al. (2009) sugere que ocorre brotamento de colaterais axônicos de interneurônios GABAérgicos que expressam somatostatina no hilo, levando a um aumento da conectividade com as células granulares. Essa reorganização dos interneurônios GABAérgicos que expressam somatostatina poderia ser um mecanismo de inibição das células granulares, compensando a perda dos interneurônios hilares vulneráveis.

1.1.2 Modelo experimental de ELT induzido por pilocarpina

Os modelos experimentais de epilepsias têm assumido um importante papel na compreensão dos mecanismos envolvidos na origem e manifestação das crises epilépticas. Dentre os modelos mais estudados destaca-se o da pilocarpina, descrito por Turski et al. (1983), que mimetiza as características histológicas, bioquímicas, farmacológicas, eletrofisiológicas e comportamentais encontradas na ELTM em humanos.

A pilocarpina é um alcalóide extraído da planta *Pilocarpus jaborandi* que age como um agonista colinérgico muscarínico. Quando aplicada sistemicamente em altas doses (300-380 mg/kg), gera um quadro de *status epilepticus* (SE – definido como crises comportamentais e/ou elétricas contínuas ou crises repetidas sem completa recuperação das funções neurológicas entre as crises, com duração de pelo menos 30 minutos) (Treiman, 1995) em roedores que parece depender da ativação de receptores muscarínicos do subtipo M1 (subtipo mais expresso no hipocampo, presente nas células piramidais de CA1 e CA3, células granulares e em alguns

interneurônios), uma vez que camundongos knockout para esse receptor não desenvolvem SE em resposta à pilocarpina (Hamilton et al., 1997; Osten et al., 2007). Além disso, a indução do SE por pilocarpina pode ser bloqueada pela administração sistêmica prévia do antagonista muscarínico atropina (Clifford et al., 1987). No entanto, uma vez que o quadro de SE está estabelecido, a aplicação de atropina não é capaz de interromper as crises, sugerindo que a transmissão colinérgica muscarínica está envolvida no início das crises, mas indicando não manutenção, participação de na sua а outros neurotransmissores (Clifford et al., 1987). De fato, um estudo realizado por Smolders et al. (1997) revelou que há elevação nos níveis de glutamato no hipocampo de ratos acompanhada pelo início das crises induzidas por pilocarpina. A ideia aceita é de que o sistema colinérgico seja responsável pela ativação inicial de neurônios excitatórios glutamatérgicos, o que daria início à atividade convulsiva. A liberação excessiva de glutamato durante o SE manteria as células despolarizadas, produzindo liberação contínua de cálcio dos estoques intracelulares, culminando em lesão de membranas celulares e de outras organelas, provocando a morte celular por excitotoxicidade (Scorza, 2006). Além disso, foi demonstrado que a pilocarpina, atuando em receptores muscarínicos, produz deseguilíbrio entre a transmissão excitatória e inibitória, gerando o quadro de SE (Priel e Albuquerque, 2002).

A descrição detalhada do modelo da pilocarpina em ratos permite caracterizar três períodos distintos: a) período agudo, em que os animais apresentam crises ininterruptas por períodos de até 12 horas (SE); b) período latente, caracterizado pela normalização comportamental e eletrencefalográfica, com duração variável de 4 a 44 dias; c) período crônico,

que se inicia com o aparecimento da primeira crise espontânea, que se torna recorrente ao longo da vida do animal (Turski et al., 1983; Leite et al., 1990).

É interessante observar que essa evolução (SE - período latente – período crônico) também é observada na ELT humana. Muitos pacientes relatam um "evento inicial" (crises prolongadas, traumatismo craniano ou infecções) nos primeiros anos de vida, seguindo-se um período assintomático até a adolescência, quando as crises geralmente têm início. Uma vez que as alterações que contribuem para a instalação do quadro epiléptico ocorrem em poucos dias no modelo, somando-se ao fato de que várias características da ELT humana são reproduzidas no modelo, torna-se clara a vantagem da utilização desse modelo.

Sendo assim, o modelo de epilepsia induzido por pilocarpina tem contribuído para a compreensão da ELT humana, possibilitando o estudo sobre mecanismos envolvidos com o processo de epileptogênese após injeção única do agonista colinérgico muscarínico.

1.1.3 Formação hipocampal

Várias funções já foram atribuídas ao hipocampo. Até os anos de 1930, a formação hipocampal era considerada como parte do sistema olfatório pelos neurocientistas. Atualmente, já se sabe que o hipocampo não é o maior componente do sistema olfatório. No entanto, a informação olfatória certamente contribui para as funções realizadas por esta estrutura (Andersen et al., 2007). Outra hipótese foi proposta por James Papez (1937), que sugeriu que o hipocampo fazia parte de uma circuitaria que fornece substrato anatômico para

as emoções, por meio de conexões com os corpos mamilares, os núcleos talâmicos anteriores e o giro do cíngulo, estabelecendo um circuito neural fechado que seria responsável pela elaboração da experiência emocional e por suas respostas (Andersen et al., 2007; Canteras e Bittencourt, 2008). No entanto, posteriormente essa hipótese foi derrubada por trabalhos que demonstraram associação entre alterações de comportamento e de emoções com lesões na amígdala (Andersen et al., 2007). Outro papel proposto para a formação hipocampal foi o controle da atenção. O ritmo teta, observado no hipocampo de coelhos por Richard Jung e Alois Kornmüller em 1938, foi relacionado com aumento da atenção. Além disso, foi proposto que a atividade teta poderia estar vinculada a estados específicos de aprendizado, e que tanto o teta hipocampal quanto o entorrinal sofreram mudanças durante a aquisição de respostas condicionadas (Andersen et al., 2007).

Apesar das várias funções propostas para a formação hipocampal, atualmente sabe-se que esta região está criticamente envolvida nos processos de aprendizado e memória, especificamente na memória declarativa / explícita, relacionada a fatos e eventos, sendo que este tipo de memória depende do hipocampo por um tempo limitado, ou seja, esta estrutura é crucial para a formação destas memórias e sua consolidação inicial (Stark, 2007). Particularmente, o hipocampo desempenha importante papel na memória para espaço e contexto, sendo que lesões no hipocampo podem desencadear problemas de orientação espacial (Kandel et al., 2003). Já a memória não-declarativa / implícita, responsável por habilidades ou procedimentos, não depende do hipocampo, e sim de outras estruturas encefálicas como cerebelo e amígdala (Kandel et al., 2003).

Além de desempenhar importante papel em algumas formas de memória e aprendizado, como citado acima, outro aspecto que confere importância ao hipocampo é o fato desta região, especificamente a zona subgranular do giro denteado, ser capaz de produzir novos neurônios no encéfalo adulto, juntamente com a zona subgranular dos ventrículos laterais (Ming e Song, 2011).

A formação hipocampal está envolvida em vários processos patológicos, mas apenas em raras situações a lesão é restrita a esta estrutura. O hipocampo está sujeito às mesmas condições patológicas que outras áreas corticais, tais como tumores, má-formações vasculares, dentre outras. No entanto, adicionalmente, o hipocampo é notável por sua particular vulnerabilidade aos danos causados por isquemia/hipóxia, trauma e hipoglicemia. Há também situações em que o envolvimento da formação hipocampal é crítica para a manifestação da doença, principalmente nos casos da doença de Alzheimer e na ELT. Na ELT, diferentemente do que ocorre na doença de Alzheimer, o hipocampo não apenas é vulnerável aos danos causados pelas crises, mas também pode atuar como substrato para a geração de crises epilépticas (Walker et al., 2007).

1.1.3.1 Anatomia da formação hipocampal

Os dois maiores responsáveis tanto pelas terminologias utilizadas para descrição do hipocampo quanto pelo conhecimento sobre sua organização celular e conectividade intrínseca, são Santiago Ramon y Cajal e seu aluno Raphael Lorente de Nó. Algumas das subdivisões feitas por eles, baseadas na

técnica de coloração de Golgi, são utilizadas até os dias de hoje apesar do avanço das técnicas usadas em neuroanatomia (Amaral e Lavenex, 2007 – p. 42).

A formação hipocampal é composta pelo hipocampo propriamente dito, sendo subdividido em três campos, CA1, CA2 e CA3 (CA: Corno de Ammon), identificados pelo neuroanatomista Lorente de Nó, além do giro denteado (GD), complexo subicular (subículo, para-subículo e pré-subículo) e córtex entorrinal (Figura 1) (Amaral e Lavenex, 2007). O termo formação hipocampal de acordo com a descrição acima é amplamente, mas não universalmente, aceito. Alguns autores consideram como sendo formação hipocampal apenas as regiões que contém três camadas (ou alocórtex, termo aplicado para regiões corticais com menos de seis camadas), ou seja, o hipocampo propriamente dito, giro denteado e o subículo. As outras regiões (pré-subículo, para-subículo e córtex entorrinal), neste caso, constituem o chamado córtex parahipocampal. Ainda, os termos hipocampo ou complexo hipocampal às vezes são aplicados para definir a combinação do hipocampo propriamente dito e o giro denteado (Amaral e Lavenex, 2007).

O giro denteado é composto por três camadas: camada molecular, relativamente desprovida de células e ocupada basicamente por dendritos das células granulares, células em cesto e polimórficas; camada de células granulares (principal tipo celular do giro denteado), que apresenta denso empacotamento de células granulares e também células em cesto, e camada polimórfica ou hilo, também chamada de CA4 por alguns autores, que contém uma variedade de neurônios não muito conhecidos, sendo o tipo mais comum as células musgosa (Amaral e Lavenex, 2007).

O hipocampo propriamente dito é dividido nas seguintes camadas:

- alveus: constituido por fibras aferentes e principalmente eferentes da formação hipocampal;
- stratum oriens: região infra-piramidal formado por axônios de células piramidais e por alguns tipos celulares, como as células em cesto (interneurônios inibitórios);
- stratum pyramidale: composto por agrupamento denso de células piramidais, principal tipo celular do CA;
- stratum lucidum: presente apenas na região CA3, camada desprovida de células, localizada acima da camada de células piramidais, composta pelas fibras musgosas;
- stratum radiatum: região supra-piramidal, constituído interneurônios e por dendritos apicais das células piramidais, que se conectam as vias colaterais de Schaffer;
- stratum lacunosum-moleculare: camada mais superficial do hipocampo, região onde as fibras do córtex entorrinal terminam. Aferentes de outras regiões, como as do tálamo, também chegam a esta camada. Possui uma variedade de interneurônios.

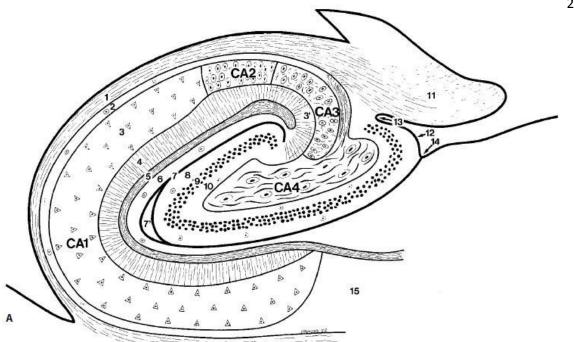


Figura 1 - Diagrama de uma secção coronal do hipocampo. CA1, CA2, CA3 e CA4 (hilo). 1: alveus; 2: stratum oriens; 3: stratum pyramidale; 3': stratum lucidum; 4: stratum radiatum; 5: stratum lacunosum; 6: stratum moleculare; 7: sulco do hipocampo; 7': cavidade residual; 8: camada molecular do giro denteado; 9: camada de células granulares; 10: camada polimórfica ou hilo do giro denteado; 11: fímbria; 12: margo denticulatus; 13: sulco fímbriodenteado; 14: sulco hipocampal; 15: subículo. FONTE: adaptado de Duvernoy, 2005.

A camada de células piramidais é caracterizada por denso empacotamento de células em CA1, diferentemente das regiões CA2 e CA3, onde o empacotamento celular é menor. A distinção entre CA3 e CA1 se dá pelo fato de que apenas CA3 recebe projeções das fibras musgosas, além do fato de que CA1 possui células menores em relação a CA2 e CA3. CA2, por sua vez, se diferencia dos dois campos anteriores, pois, além de ainda apresentar células grandes, como CA3, não recebe projeções das fibras musgosas (Amaral e Lavenex, 2007).

A maior justificativa para o agrupamento das seis regiões na chamada formação hipocampal reside no fato de que elas são conectadas por vias neuronais largamente unidirecionais de forma singular. O termo "circuitaria tri-

sináptica" (Figura 2) é um grande exemplo dessa peculiaridade da formação hipocampal, uma vez que ela compreende uma via sequencial de sinapses glutamatérgicas excitatórias, sendo que a inibição se faz principalmente por interneurônios localizados no hilo e na região do CA. Essa circuitaria tem início na via perfurante, que parte do córtex entorrinal em direção ao giro denteado; dali seguem as fibras musgosas (axônios das células granulares) em direção à porção proximal dos dendritos das células piramidais de CA3; por fim, de CA3 saem projeções em direção à região proximal dos dendritos das células piramidais de CA1, conhecidas como via colateral de Schaffer. Entretanto, com a descoberta de projeções robustas de CA1 para o subículo e córtex entorrinal, e de grandes projeções do córtex entorrinal para o neocórtex, a via tri-sináptica é agora apenas uma dentre as várias circuitarias funcionais da formação hipocampal (Amaral e Lavenex, 2007).

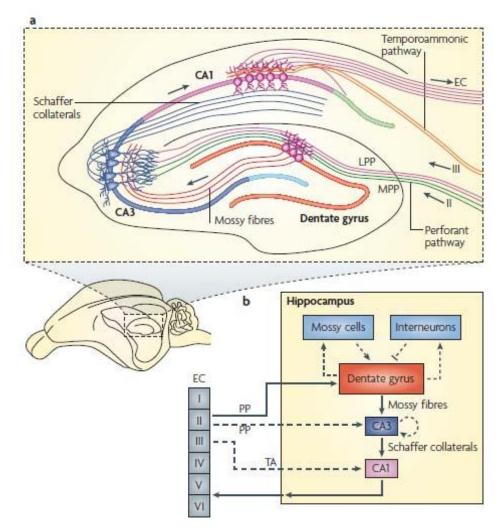


Figura 2 – Circuitaria neural da formação hipocampal de roedores. a) ilustração da circuitaria hipocampal. b) diagrama da rede neural hipocampal. A via trisináptica excitatória (CE-GD-CA3-CA1-CE) está destacada por setas sólidas. EC: córtex entorrinal; PP: via perfurante; LPP: via perfurante lateral; MPP: via perfurante medial; TA: via temporoamônica. FONTE: Deng et al., 2010.

1.2 CANAIS DE JUNÇÕES COMUNICANTES

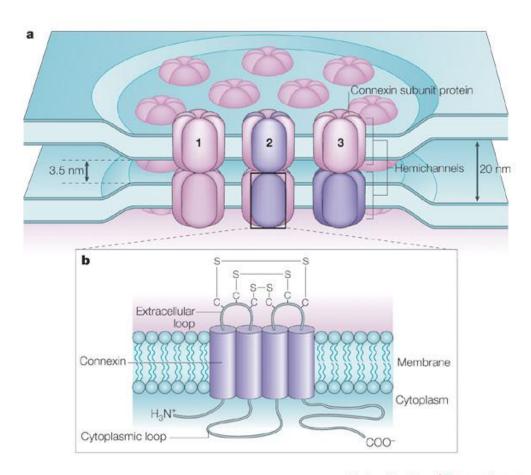
Os canais de junções comunicantes (JC, *gap junctions*) são especializações na membrana que permitem a comunicação intercelular metabólica e elétrica de forma direta entre quase todos os tipos celulares do encéfalo e de outros tecidos (Sohl et al., 2005; Laird, 2006). A função destes

canais na biologia celular e tecidual é de extrema importância uma vez que a comunicação provida por eles existe em quase todos os tipos celulares de mamíferos (Laird, 2006).

Enquanto os canais formados por Cx servem ao propósito comum de permitir a troca intercelular de pequenos metabólitos, segundos mensageiros e sinais elétricos, a diversidade de funções é atribuída ao subconjunto de Cx expresso em um tipo celular. Por exemplo, a permeabilidade dos canais de JC às moléculas que diferem em tamanho, forma e carga pode variar dependendo da composição dos subtipos de conexinas expressos, resultando em ampla variedade de seletividades (Laird, 2006).

Os canais de JC são formados por um par de hemicanais (conéxons), situados nas membranas de células justapostas, que por sua vez são compostos por seis subunidades proteicas chamadas conexinas (Cx). As Cx possuem quatro domínios transmembrânicos, duas alças extracelulares e três componentes citoplasmáticos (uma alça citoplasmática e os segmentos amino e carboxi terminais) (Figura 3) (Söhl et al., 2005). Até o momento, vinte e uma Cx foram identificadas, e onze destas foram detectadas no encéfalo de vertebrados (Sohl e Willecke, 2004; Evans et al., 2006; Giaume et al., 2010). Os hemicanais possuem afinidade seletiva entre si, formando canais homotípicos, heterotípicos ou heteroméricos. Os canais homotípicos são compostos por 12 subunidades de Cx idênticas. Os canais heterotípicos, porém homoméricos, são formados por conéxons diferentes, porém cada conéxon é composto pela mesma Cx. Nos canais heteroméricos as Cx que formam um conéxon são diferentes nas duas células adjacentes (Figura 3). Ainda, os canais também podem ser classificados em homólogos (canais formados por

hemicanais de duas células do mesmo tipo) ou heterólogos (canais formados por hemicanais de duas células de tipos variados) (Rozental, 2000; Laird, 2006).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 3 – Organização molecular e esquema topográfico de canais de JC.

a) hemicanais de membranas plasmáticas de células justapostas formando canais de junções comunicantes. Três diferentes tipos de canais são descritos: homomérico/homotípico (1), heteromérico (2) e heterotípico (3), de acordo com a composição molecular. Cada hemicanal compreende a junção de seis subunidades proteicas conhecidas como Cx. b) Molécula de Cx com os quatro domínios transmembrânicos, os três segmentos citoplasmáticos e as alças extracelulares. FONTE: Söhl et al., 2005.

As Cx possuem massa molecular entre 25-62 kDa, e o tamanho dessas proteínas confere o nome às mesmas, sendo que cada Cx possui seu padrão de expressão. Geralmente, mais de um tipo de Cx é encontrado em um dado tipo celular (Giaume et al., 2010), aumentando a complexidade destes canais.

Além disso, os canais formados por diferentes Cx possuem regulação diferenciada, tanto ao que se refere à biofísica do canal (Barrio et al., 1992), quanto à expressão gênica e proteica, que pode ser alterada diferentemente para cada Cx por hormônios, condições da matriz extracelular e fases do ciclo celular (Bennett et al., 1991). Trabalhos recentes demonstram que as Cx podem atuar também como hemicanais, permitindo a troca de moléculas entre o citoplasma e o meio extracelular, estabelecendo desse modo ações autócrinas e parácrinas (Bennet et al., 2003; Ye et al., 2003; Spray et al., 2006; Giaume et al., 2010). Esses hemicanais podem ser abertos por sinais ou condições, que incluem despolarização da membrana, redução dos níveis extracelulares de Ca²⁺, alterações de Ca²⁺ citoplasmático, estimulação mecânica, mudanças no estado de fosforilação, hipóxia/isquemia, entre outros (Decrock et al., 2009). Quando abertos, esses hemicanais permitem a entrada de íons como Ca²⁺ e Na⁺, ou então a saída de metabólitos essenciais como ATP, glutamato, prostaglandinas e outros (Decrock et al., 2009). Além dos hemicanais compostos por Cx, outra família de proteínas composta por apenas três membros, e conhecidas como panexinas (Px1, Px2 e Px3), podem compor os canais de JC. Essas proteínas são co-expressas com as Cx e atuam primariamente como hemicanais, estabelecendo, assim como os hemicanais formados por Cx, comunicação entre o citoplasma e o meio extracelular (Iglesias et al., 2009; D'hondt et al., 2011).

No sistema nervoso, a comunicação elétrica através de canais de JC ocorre entre neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e micróglia (Nagy e Rash, 2000; Parenti e Campisi, 2002), assim como entre diferentes tipos celulares, como nas junções neurônio-astrócito (Nedergaard, 1994) e astrócito-oligodendrócito (Nagy e Rash, 2000).

Dentre os tipos de Cx, as Cx36 e Cx43 são amplamente distribuídas no encéfalo. A Cx36 encontra-se principalmente em neurônios, especialmente em interneurônios (Condorelli et al., 1998, 2003). Na região da formação hipocampal, a Cx36 é expressa em todas as regiões, incluindo o córtex entorrinal (Condorelli et al., 2000), apresentando-se nos interneurônios GABAérgicos localizados em várias camadas de CA1, CA3 e giro denteado. Em relação às células principais, apenas as células piramidais de CA3 expressam a Cx36 (Condorelli et al., 2000). Já a Cx43, Cx mais expressa em mamíferos, está presente em pelo menos 35 tecidos distintos (Laird, 2006). Sua distribuição no SNC também é abundante, inclusive no hipocampo, onde é predominantemente expressa em astrócitos (Dermietzel e Spray, 1993; Theis et al., 2003), sendo que estas células são extensivamente acopladas por canais formados por essa proteína nas JC.

1.2.1 Canais de JC e epilepsia

Atividade elétrica excessiva e sincronizada de certos grupos neuronais é uma das causas da ocorrência de crises, podendo, por sua vez, resultar de distúrbios da homeostase intracelular, ou de um desequilíbrio entre a atividade excitatória e inibitória. As descargas elétricas sincronizadas e excessivas em

fatias de hipocampo durante indução de atividade em um meio sem cálcio, com a transmissão sináptica química bloqueada, têm sido atribuídas aos canais de JC (Konnerth et al., 1986; Schweitzer et al., 1992; Valiante et al., 1995). Além disso, a atividade anormal que um pequeno grupo de células apresenta pode se espalhar e envolver grandes grupos neuronais, gerando, desse modo, o típico quadro de crise generalizada. Essa generalização pode envolver os canais de JC, presentes entre as células do sistema nervoso (neurônios e glia) e que permitem a propagação de atividade elétrica (Dermietzel, 1998).

Experimentos realizados por Getting e Willows (1974) geraram as primeiras evidências de que o acoplamento eletrotônico pode modificar as propriedades intrínsecas dos neurônios e levar a geração de população de espículas sincronizadas. Esses autores demonstraram, em neurônios de *Tritonia*, que o início e fim das espículas dependem do acoplamento elétrico pelo fato de que este permite que a despolarização e a hiperpolarização sejam transmitidos de célula a célula.

O papel dos canais de JC na geração de crises epilépticas tem sido estudado mais detalhadamente em modelos de epilepsia *in vivo*, *in vitro*, em tecido humano e em simulações computacionais (Val-da Silva et al., 2010). Traub et al. (2001) mostraram que o acoplamento elétrico entre neurônios, talvez via JC axonais, poderia constituir a base das oscilações muito rápidas (> 70 Hz), sendo que tal atividade parece surgir na proximidade de regiões de início das crises, e poderia ter significado funcional indicador do foco epiléptico. Esses autores também demonstraram que tais oscilações muito rápidas podem preceder o início das crises, além de que essa atividade ocorre

espontaneamente em fatias hipocampais e que ela depende de JC e não de transmissão sináptica química.

A constatação da existência de oscilações muito rápidas no início de crises em pacientes com epilepsia levou vários autores a investigar a relação entre canais de JC e crises epilépticas. Nesse sentido, Bragin et al. (2002) avaliaram a extensão da área de geração de oscilações na faixa de frequência entre 250-600 Hz, conhecidas como oscilações de alta frequência (fast ripples), no hipocampo de ratos com crises espontâneas tratados com ácido caínico. Os autores observaram a existência de áreas capazes de gerar oscilações de alta frequência espontâneas e evocadas na circuitaria córtex entorrinal-hipocampo, e concluem que, apesar do forte controle inibitório da excitabilidade proveniente da rede de interneurônios, as conexões excitatórias altamente interconectadas são capazes de superar a inibição e gerar disparos epileptiformes, levando, eventualmente, ao surgimento da atividade epileptiforme.

Alterações na expressão de Cx têm sido descritas tanto em modelos experimentais de epilepsia como em pacientes com epilepsia. Aumento nos níveis de mRNA das Cx43, Cx32 e Cx36 foi observado no modelo de epilepsia induzido por 4- aminopiridina (Gajda et al., 2003). Além disso, esses autores demonstraram que a abertura ou bloqueio dos canais de junções comunicantes pode aumentar ou diminuir, respectivamente, a duração das crises. Na tentativa de elucidar se a astrocitose que ocorre na ELT é acompanhada de aumento na expressão da Cx43 (astrócitos são acoplados predominantemente pela Cx43), Fonseca et al. (2002) estudaram a expressão dessa Cx em tecidos obtidos de pacientes com ELT. Esse estudo revelou imunomarcação aumentada de Cx43 e GFAP nas regiões CA1 e CA4 desses pacientes,

sugerindo uma via de propagação rápida do sinal elétrico pela Cx43, contribuindo para a generalização das crises. No modelo do ácido caínico, foi reportada redução dos níveis de mRNA da Cx36 no hipocampo de ratos (Sohl et al., 2000).

Embora esses dados reforcem a ideia de que os canais de junções comunicantes exercem uma função importante na epilepsia, seu papel exato nessa patologia ainda é pouco conhecido.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a expressão de Cx no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de ELT induzido por pilocarpina, bem como avaliar os efeitos do uso de um bloqueador de canais de junções comunicantes nas crises induzidas por pilocarpina.

2.2 ESPECÍFICOS

- Quantificar por immunoblotting a expressão proteica de Cx43 e
 Cx36 no hipocampo de ratos nos três períodos do modelo da pilocarpina;
- Quantificar por PCR em tempo real os níveis de RNAm de Cx43 e
 Cx36 nas condições acima descritas;
- Avaliar por registros eletrofisiológicos os efeitos do uso do bloqueador de canais de JC carbenoxolona no SE induzido por pilocarpina.



3.1 INDUÇÃO DO SE

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 270 g e 300 g, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em temperatura controlada (20-22°) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram alimentados com ração balanceada para ratos e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais, que incluem a indução do SE e decapitação dos animais, foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo nº 19, fl. 67, livro 02).

Os animais foram previamente tratados (30 minutos antes da administração da pilocarpina) com metil-escopolamina (Sigma, 1 mg/kg, s.c.), visando minimizar os efeitos periféricos da pilocarpina. Os animais receberam pilocarpina via intraperitoneal (Sigma, 360 mg/kg), diluída em salina estéril. Os animais utilizados nos períodos latente e crônico receberam diazepam (10 mg/kg) para interrupção do estado de mal epiléptico na quarta hora após o início do mesmo.

Para os protocolos de *immunoblotting* e PCR em tempo real os animais foram eutanasiados nos seguintes tempos após o início do SE: 4 horas (período agudo), 3 dias (período latente) e 120 dias (período crônico).

A confirmação de que os animais já se encontravam no período crônico do modelo foi realizada por meio de filmagem por um período de duas

semanas. Este monitoramento foi realizado no laboratório da Prof^a Angela Cristina do Valle, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2 IMMUNOBLOTTING

Para o ensaio de *immunoblotting* foram utilizados 35 animais, distribuídos da seguinte maneira: agudo controle, N=5; agudo experimental, N=5; latente controle, N=5; latente experimental, N=6, crônico controle, N=7 e crônico experimental, N=7.

Os animais foram decapitados de acordo com os tempos de estudos propostos e os hipocampos foram rapidamente coletados e homogeneizados em tampão de extração (Tris pH 7,4 100 mM, EDTA 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/mL) com auxílio de um sonicador. As amostras foram então centrifugadas por 30 minutos a 12.000 rpm em uma microcentrífuga refrigerada. O sobrenadante foi separado do pellet e reservado. Parte desse sobrenadante de cada amostra foi diluído a 1:20 em água destilada e utilizado para a dosagem de proteína do sobrenadante, determinada usando um kit para ensaio de proteínas (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). As amostras dos homogenatos (100 µg de proteína) tratados com tampão Laemmli contendo DTT 100 mM foram submetidas à eletroforese em géis de acrilamida a 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) utilizando uma cuba para mini-gel. Após a separação eletroforética, as proteínas foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm de diâmetro) utilizando-se um sistema de transferência (Trans-Blot cell system), em tampão contendo SDS. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio contendo 5% de leite desnatado em salina tamponada contendo Tween 20 (TTBS; 0,01 M de Tris-HCI, pH 7,4, 0,15 M de NaCI, 0,05% de Tween 20) durante pelo menos duas horas sob agitação leve e incubadas a 4 °C, sob leve agitação, durante 12-16h com um anticorpo policional contra Cx43 (1:1000) ou contra Cx36 (1:1000), ambos feitos em coelho. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos cada em TTBS e posteriormente incubadas por pelo menos 2 horas com um anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (Amersham) diluído a 1:5000, em solução para incubação contendo 1% de leite desnatado em TTBS. Novamente as membranas foram lavadas em TTBS por 3 vezes de 10 minutos e a ligação específica do anticorpo com a proteína revelada utilizando o kit quimioluminescente ECL (Amersham). Finalmente, as bandas foram analisadas densitometricamente com o programa NIH-Scion Image 4.0.2 (Scion Corporation).

3.3 PCR EM TEMPO REAL

Nesta etapa foram utilizados 39 animais, sendo 12 para o grupo agudo (5 controles e 7 experimentais), 14 para o grupo latente (6 controles e 8 experimentais) e 13 para o grupo crônico (5 controles e 8 experimentais).

A extração do RNA dos hipocampos foi realizada isoladamente para cada amostra. Após a coleta, o material foi macerado em 1 mL do reagente TRIzol® com o auxílio de um sonicador. Ao macerado foram adicionados 200 µL de clorofórmio e as amostras foram centrifugadas (12000 rpm, 4°C) durante

15 minutos. A fase aquosa resultante foi transferida para um microtubo e foram adicionados 500 µL de isopropanol. O material foi incubado durante 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos (12000 rpm, 4 °C) e o sobrenadante descartado. O precipitado contendo o RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado novamente por 10 minutos (7500 rpm). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 25 µL de água livre de RNAse (Promega, EUA). A concentração de mRNA foi quantificada por espectrofotômetro em 260nm. O DNA residual foi removido pela adição de DNAse I conforme protocolo do fabricante. Para a reação de transcrição reversa (RT) do mRNA para cDNA, para cada 20 µL de reação, 4 µg do RNA total foram misturados com 1 µL de oligo dT (0,5 µg; Invitrogen) e a mistura foi incubada por 10 minutos a 65 °C. Posteriormente, foram acrescentados nucleotídeos e enzimas para a formação de cDNA, entre eles 1 µL da enzima transcriptase reversa SuperScript III (200 U; Invitrogen), e as amostras foram incubadas por 60 minutos a 50 °C. A reação foi inativada por 15 minutos na temperatura de 70 °C.

A reação de PCR em tempo real incluiu o seguinte: 100 nM de *primers* específicos para Cx43, Cx36 e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), usado como controle interno (*housekeeping gene*) (Tabela 1), 5 ng de amostras de cDNA e 1X SYBR® Green PCR Master Mix (APplied Biosystems). Utilizando sistema de detecção Rotor-Gene Q da Qiagen, os ciclos foram realizados nas seguintes condições: após ativação inicial a 50 °C por 2 minutos e a 95 °C por 10 minutos, as condições de ciclo foram 95 °C por 10 segundos e 60 °C por 1 minuto. Curvas de dissociação para avaliação da especificidade dos *primers*

foram obtidas pelo aquecimento das amostras de 60 °C até 95 °C. Os *primers* 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 em detalhes por Medhurst et al. (2000). O valor do CT foi determinado subtraindo os valores do CT de cada amostra da média dos respectivos valores do CT do *housekeeping gene*. O cálculo do $\Delta\Delta$ CT se deu pela subtração de cada Δ CT da constante arbitrária determinada pelo cálculo da média dos valores de Δ CT dos grupos controle. As mudanças na expressão gênica dos genes de interesse são equivalentes a $2^{-\Delta\Delta$ CT}. Os níveis de RNAm de Cx43 e Cx36 foram corrigidos com o controle interno GAPDH.

Tabela 1 – Descrição dos *primers* utilizados para estudar os genes de interesse e o *housekeeping gene**.

Gene (Código GenBank)	Sequência dos <i>Primers</i> (5' a 3')	Comprimento do Amplicon (bp)	
Cx43 (AY324140)	FW: TTCCTCGTGCCGCAATTAC RV: CGATTTTGCTCTGCGCTGTA	72	
Cx36 (NM_019281)	FW: CTGCAGCCCGGCTGTAA RV: AGTAACGTATATGGGAGATGGGAAA	64	
GAPDH [*] (BC059110)	FW: GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG RV: GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA	197	

3.4 EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS DO BLOQUEIO DE CANAIS DE JC

3.4.1 Implante de eletrodos

Os eletrodos para registro dos eletrocorticogramas foram confeccionados com fio de níquel-cromo de 150 µm de diâmetro, isolados com teflon, provenientes da California Fine Wire Company®. Os eletrodos para registro cortical, bipolares de derivação curta, foram preparados colando-se em paralelo dois segmentos de fios com aproximadamente 3 cm de comprimento e cuja porção terminal foi dobrada em T em cerca de 0,5 mm, da qual se removia o isolante, para tornar essa região permeável às correntes elétricas geradas no tecido nervoso. Os eletrodos foram implantados bilateralmente nas áreas corticais somestésicas (A3) AP= -1,5mm; L= ±3,0mm. A implantação dos eletrodos corticais foi realizada de acordo com as coordenadas do mapa de projeções nos ossos do crânio, de acordo com Timo-laria et al. (1970) e Valle et al. (1992) (Figura 4).

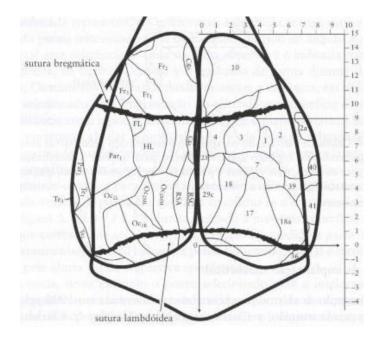


Figura 4 - Mapa citoarquitetônico (à direita, segundo Krieg, 1946) e funcional (à esquerda, segundo Zilles, 1991), projetado sobre perfil e ossos do crânio e das suturas bregmáticas e lambdóidea, indicando as áreas da superfície dorsal. Escalas à direita e acima em milímetros, em relação aos zeros estereotáxicos antero-posterior (0 AP) e médio-lateral, respectivamente. Abreviaturas: F1, córtex motor primário; F2 e F3, áreas pré-frontais; P1 e P2, áreas parietais 1 e 2; Ma, área de projeção somestésica do membro anterior; Occ1M, área occipital medial 1; Occ2M, área occipital medial 2; OccL2, área occipital lateral 2; CG1, giro do cíngulo 1; RSG, córtex retroesplênico granular; RSA, córtex retroesplênico agranular; 29d, área 29 D; T1, área auditiva primária. Imagem cedida pela Profª. Dra. Angela C. Valle.

Antes da fixação do rato no aparelho estereotáxico procedia-se à anestesia com cloridrato de cetamina (Ketalar®, 30 mg/kg). A injeção de Ketalar® foi precedida de administração de 0,2 mL de Diazepam, a fim de se provocar suave sedação, facilitadora da anestesia. Assim que esta atingisse nível adequado, a cabeça do rato foi imobilizada no aparelho estereotáxico Kopf®, fixando os condutos auditivos externos e o maxilar superior ao cabeçote do aparelho estereotáxico Kopf®. Em seguida foi realizada uma incisão longitudinal na pele que recobre o crânio, desde a sutura bregmática até a inserção dos músculos trapézios. Com uma rugina, a fáscia craniana foi

desinserida e a porção exposta foi lavada com água oxigenada a 10%, marcando-se então os pontos a trepanar. Ao longo de todo o procedimento de implantação dos eletrodos o rato foi cuidadosamente observado, para se identificar superficialização da anestesia, que se manifesta com aumento da freqüência e da amplitude respiratórias. Quando a anestesia começava a se superficializar, a dose original de anestésico era suplementada, até que se recuperasse o grau prévio de anestesia. Geralmente a dose de anestésico adequada para isso é 10% da inicial; alguns ratos, porém, necessitavam de duas ou três doses adicionais. A trepanação, em cada ponto já marcado, foi feita com uma broca de ¼ movida por uma minifuradeira Dremel®. A área de cada orifício era, portanto, maior que o diâmetro dos eletrodos, a fim de que estes passassem livremente por ele. Os eletrodos foram implantados por mobilização manual (Figura 5).

Após total recuperação da cirurgia (7 a 10 dias), os animais foram submetidos aos registros eletrocorticográficos.

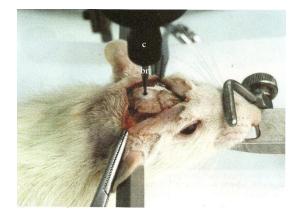




Figura 5 - Foto ilustrativa da cirurgia de implante de eletrodos. Imagem cedida pela Prof^a. Dra. Angela C. Valle.

3.4.2 Registros eletrocorticográficos

Essa etapa do projeto foi realizada em colaboração com o laboratório da Prof^a. Angela Cristina do Valle, da Faculdade de Medicina da USP.

Para a obtenção dos registros eletroscilográficos, os animais foram colocados em caixa acrílica acondicionada no interior de uma caixa metálica com isolamento eletromagnético (gaiola de Faraday), a fim de se evitar a contaminação do registro eletrográfico com interferências externas (Figura 6).

Os registros foram realizados em um eletrencefalógrafo Nihon-Koden (mod. Neurofax EEG 4400, Figura 6) com 21 canais, com pulso de calibração de 20 µV, constante de tempo 0,3 s para as derivações encefálicas, filtros passa - baixa em 35 Hz para as derivações encefálicas, em 120 Hz para as derivações actigráficas e filtros "notch" para atenuação das frequências de 60 Hz. Os potenciais foram registrados diretamente em papel (15 mm/s) e por meio de um sistema analógico-digital (placa conversora CAD 12/32 e programa de aquisição de sinais biológicos - Aqdados para Windows, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda). Os sinais foram armazenados no disco rígido de um computador para posterior análise. Os animais foram monitorados visualmente e seus comportamentos foram anotados para posterior correlação com os registros eletrocorticográficos.



Figura 6 - Sistema de registro e aquisição dos sinais eletroscilográficos. A gaiola metálica provê isolamento farádico e está aterrada ao eletroencefalógrafo, para evitar interferência eletromagnética do meio ambiente. Imagem cedida pela Prof^a. Dra. Angela C. Valle.

3.4.3 Indução do SE e tratamento com carbenoxolona (CBX)

A escolha da dose de CBX utilizada neste estudo foi baseada em dados existentes na literatura (Gareri et al., 2004, 2005; Gigout et al., 2006^a).

Os registros eletrocorticográficos, realizados em 3 grupos de animais, denominados controle CBX, controle SE e experimental SE + CBX, foram obtidos de acordo com os protocolos abaixo (Figuras 7, 8 e 9):

Controle CBX (N=5)

 a) Registro basal: trinta minutos de registro sem qualquer tipo de intervenção após igual período de duração sem registro para adaptação do animal à gaiola;

- Registro metil-escopolamina: trinta minutos de registro após injeção subcutânea de metil-escopolamina (1 mg/kg);
- c) Registro salina: trinta minutos de registro após injeção intraperitoneal de solução salina 0,09%;
- d) Registro CBX: registro contínuo (pelo menos 2 horas) após injeção intraperitoneal de CBX (60 mg/kg).



Figura 7 - Delineamento experimental do grupo Controle CBX.

Controle SE (N=5)

- a) Registro basal: trinta minutos de registro sem qualquer tipo de intervenção após igual período de duração sem registro para adaptação do animal à gaiola;
- Registro metil-escopolamina: trinta minutos de registro após injeção subcutânea de metil-escopolamina (1 mg/kg);
- c) Registro SE: trinta minutos de registro após o estabelecimento do SE, induzido através de injeção intraperitoneal de pilocarpina (360 mg/kg);
- d) Registro Salina: registro contínuo (pelo menos 2 horas) após aplicação de salina.



Figura 8 – Delineamento experimental do grupo Controle SE.

Experimental SE + CBX (N=7)

- a) Registro basal: trinta minutos de registro sem qualquer tipo de intervenção após igual período de duração sem registro para adaptação do animal à gaiola;
- Registro metil-escopolamina: trinta minutos de registro após injeção subcutânea de metil-escopolamina (1 mg/kg);
- c) Registro SE: trinta minutos de registro após o estabelecimento do SE, induzido através de injeção intraperitoneal de pilocarpina (360 mg/kg);
- d) Registro CBX: registro contínuo (pelo menos 2 horas) após injeção intraperitoneal de CBX (60 mg/kg).

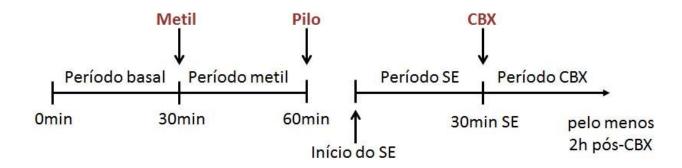


Figura 9 - Delineamento experimental do grupo Experimental SE + CBX.

3.4.4 Análise visual e instrumental dos eletrocorticogramas

Os registros corticais foram submetidos à análise visual para a caracterização dos padrões eletroscilográficos de acordo com os critérios já estabelecidos no Laboratório de Neurociências "Prof Cesar Timo-Iaria" (Timo-Iaria et al., 1970; Valle et al., 1992). Em seguida, foram submetidos à análise espectral trechos escolhidos dos eletroscilogramas do período basal, período de SE e períodos após aplicação de CBX e salina, correlacionando os respectivos espectrogramas com os resultados da análise visual dos traçados.

3.4.5 Análise espectral

A análise espectral de frequência tem por finalidade determinar as frequências que compõem um sinal complexo, como por exemplo, um eletroscilograma. O programa de análise empregado nesta análise é baseado na transformação rápida de Fourier e foi desenvolvido sobre a plataforma MATLAB.

A determinação do espectro de frequência requer algumas condições como a estacionaridade dos sinais em função do tempo. Os eletroscilogramas neurais, por exemplo, são fracamente estacionários por curtos períodos de tempo devido a sua alta complexidade, mas isso não impede que sejam submetidos à análise espectral, tampouco a invalidam; ao contrário, resultando os eletroscilogramas da composição algébrica de potenciais de duração de cerca de 1 milissegundo, a análise das oscilações em períodos muito curtos fornece informações relevantes e imperceptíveis a olho nu.

O espectro de frequência representa a distribuição da amplitude dos potenciais em função da frequência (por isso expresso em µV/Hz); o espectro

de potência exprime (em $\mu V^2/Hz$) a energia contida em uma sequência de sinais iterativos e é calculado pela integral dos quadrados das voltagens dos sinais em certo intervalo de tempo segundo a frequência, permitindo estabelecer a distribuição média da potência de um sinal com relação à frequência. Quando o sinal varia ritmicamente, sua potência se concentra na frequência fundamental e de seus harmônicos (se houver), ocorrendo oscilações irregulares em outras frequências, sem concentrações em faixas específicas.

Para que a análise espectral refletisse de forma mais acurada os efeitos dos tratamentos farmacológicos (metil-escopolamina, pilocarpina, CBX e salina) sobre a atividade neuronal, amostras (épocas) de EEGs com janelas de 10 segundos de cada período, de cada animal de todos os grupos foram selecionadas e submetidas às análises descritas a seguir.

Os potenciais de campo foram filtrados entre 0,1 Hz e 60 Hz. Foi calculada a média das épocas de cada animal, correspondentes aos trechos pré-estabelecidos dos potenciais de campo.

Para a obtenção dos espectrogramas de frequência, foi utilizado o método de Transformada de Fourier com janelamento de Kaiser de 1024 pontos, expressando as magnitudes em cores, relativas ao eixo de frequências em função do tempo. A Densidade Espectral de Potência (PSD, do inglês *Power Spectral Density*) é definida pela Transformada de Fourier da função de autocorrelação (consiste em comparar o sinal oscilante consigo mesmo, porém submetidos a defasagens crescentes, o que o faz oscilar; se o sinal é perfeitamente senoidal, ocorrem coincidências e extinções periódicas, mas o sinal é sempre periódico) que descreve a distribuição da variância de um

processo aleatório no domínio da frequência. Utilizando o Método de Welch com 50% de sobreposição de janelamento, foram calculados, a partir do sinal médio dos potenciais de campo, periodogramas de cada segmento e realizada a média das estimativas dos PSDs, resultando no PSD de Welch.

A variação da amplitude do potencial de campo foi obtida a partir da razão entre a amplitude média dos períodos em relação ao potencial médio do período basal em μV para cada rato. Os valores estão expressos em média ± desvio padrão.

Para avaliação da potência da faixa de frequência entre 15 e 30 Hz nos grupos controle SE e experimental SE + CBX, foi calculada a potência média do sinal de cada animal ao longo do intervalo entre o início do SE e 2 horas após a aplicação de salina ou CBX, de acordo com o grupo. A partir destes dados foi calculado o intervalo mínimo para início da alteração da potência nessa faixa de frequência nos dois grupos. Os dados estão apresentados como média (segundos) ± desvio padrão.

Para análise dos períodos *flat* observados nos traçados dos animais em SE, foi utilizado uma janela mínima de 250 ms para detecção destes períodos a partir da aplicação de salina (grupo controle SE) ou CBX (grupo SE + CBX) até 2 horas após. Foi calculada a média de tempo ± desvio padrão (em segundos) que cada animal levou para apresentar esses intervalos.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios de *immunoblotting* e PCR em tempo real foram avaliados pelo teste "t" de Student não-pareado, comparando os grupos controle e experimental.

Em relação aos dados eletrofisiológicos, a análise da variação da amplitude do potencial de campo do grupo Controle CBX foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via para comparação dos períodos basal, metil, salina e CBX. Para comparação entre os mesmos períodos dos três grupos, foi utilizado o teste ANOVA de duas vias associada ao pós-teste de Bonferroni. Os dados referentes à potência da faixa de frequência entre 15 e 30 Hz e os resultados da análise dos períodos *flat* (comparando grupos controle SE e experimental SE + CBX), foram avaliados pelo teste "t" de Student não-pareado.

Foram considerados estatisticamente significantes valores de p<0,05.

4 RESULTADOS

4.1 SE – RESULTADO COMPORTAMENTAL

Do total de animais submetidos à injeção de pilocarpina (N=97) e utilizados para os ensaios de immunoblotting e PCR em tempo real, 100% desenvolveram o estado de mal epiléptico. Destes, 41 sobreviveram até os tempos estipulados (43%), e 56 morreram antes (57%). Após a administração da pilocarpina, animais apresentaram as seguintes alterações os comportamentais: acinesia inicial, wet dog shakes, movimentos atáxicos e automatismos mastigatórios com salivação. Este tipo de comportamento progrediu para tremores generalizados, clonias localizadas nas extremidades, convulsivas evoluindo breves crises motoras, para generalizadas e ininterruptas culminando no SE (o tempo de latência para o início do SE variou entre 15 e 40 minutos).

4.2 IMMUNOBLOTTING

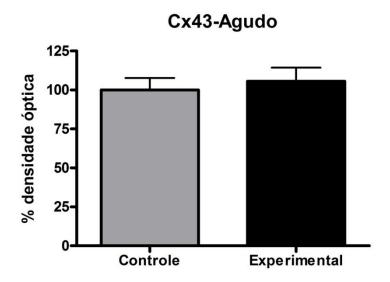
A eletroforese da Cx43 em gel de poliacrilamida evidenciou a presença dessa proteína no hipocampo dos animais utilizados nesse estudo. A Cx43 pode em geral ser observada na eletroforese nas formas fosforilada e não fosforilada, que são detectadas por bandas de 43 kDa e 41 kDa, respectivamente. No entanto, em nosso estudo, essas isoformas não foram facilmente detectadas, e por esse motivo, os resultados serão descritos considerando-se a proteína total.

Os dados obtidos não indicam modulação significativa (teste "t") de Cx43 no hipocampo dos animais durante o período agudo do modelo (Figura 10). Já no período latente a expressão dessa proteína diminuiu de modo significativo (p<0,05) no grupo experimental (Figura 11), e em relação ao grupo crônico, a Cx43 apresentou-se aumentada nos animais submetidos ao SE (p<0,01) (Figura 12).

Assim como a Cx43, a eletroforese da Cx36 em gel de poliacrilamida também evidenciou a presença dessa proteína no hipocampo de ratos. Não foram observadas alterações da expressão de Cx36 no hipocampo dos grupos experimentais em relação aos controles em nenhum dos períodos avaliados (Figuras 13, 14 e 15).

Os resultados estão resumidos na Tabela 2.





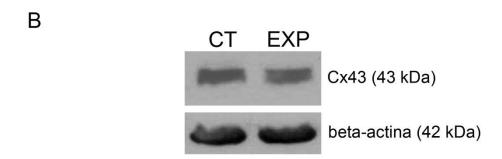
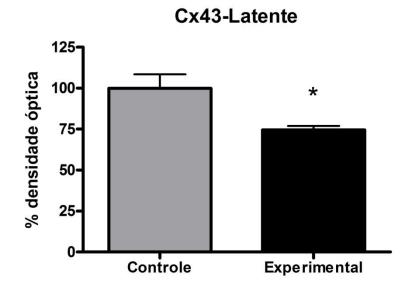


Figura 10 - Immunoblotting mostrando a expressão protéica da Cx43 no hipocampo de ratos durante o período agudo do modelo da pilocarpina. Os dados estão representados por bandas (B) e em média da razão entre a densidade óptica de bandas imunorreativas para Cx43 e da beta-actina (A). O gráfico representa a densidade óptica no grupo experimental em relação ao controle, tomado como 100%. Valores apresentados como porcentagem da média da densidade óptica ± EPM.



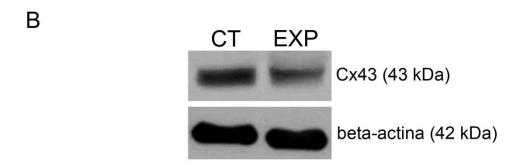
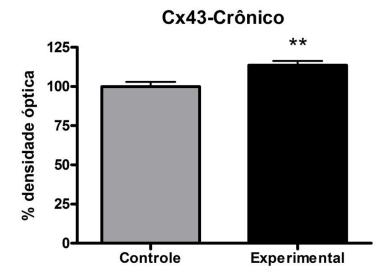


Figura 11 - Immunoblotting mostrando a expressão protéica da Cx43 no hipocampo de ratos durante o período latente do modelo da pilocarpina. Os dados estão representados por bandas (B) e em média da razão entre a densidade óptica de bandas imunorreativas para Cx43 e da beta-actina (A). O gráfico representa a densidade óptica no grupo experimental em relação ao controle, tomado como 100%. Valores apresentados como porcentagem da média da densidade óptica ± EPM. *p<0,05 (teste "t")



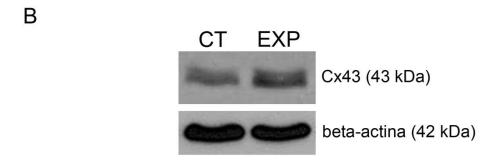
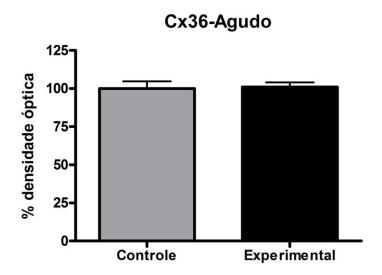


Figura 12 - Immunoblotting mostrando a expressão protéica da Cx43 no hipocampo de ratos durante o período crônico do modelo da pilocarpina. Os dados estão representados por bandas (B) e em média da razão entre a densidade óptica de bandas imunorreativas para Cx43 e da beta-actina (A). O gráfico representa a densidade óptica no grupo experimental em relação ao controle, tomado como 100%. Valores apresentados como porcentagem da média da densidade óptica ± EPM. **p<0,01 (teste "t")



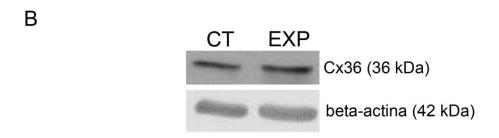
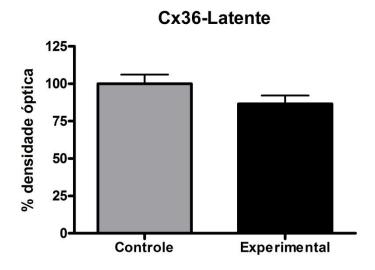


Figura 13 - Immunoblotting mostrando a expressão protéica da Cx36 no hipocampo de ratos durante o período agudo do modelo da pilocarpina. Os dados estão representados por bandas (B) e em média da razão entre a densidade óptica de bandas imunorreativas para Cx36 e da beta-actina (A). O gráfico representa a densidade óptica no grupo experimental em relação ao controle, tomado como 100%. Valores apresentados como porcentagem da média da densidade óptica ± EPM.



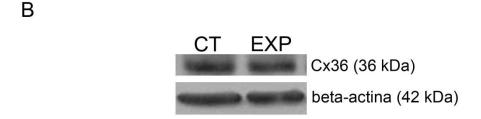
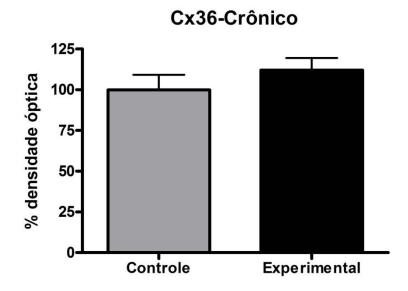


Figura 14 - Immunoblotting mostrando a expressão protéica da Cx36 no hipocampo de ratos durante o período latente do modelo da pilocarpina. Os dados estão representados por bandas (B) e em média da razão entre a densidade óptica de bandas imunorreativas para Cx36 e da beta-actina (A). O gráfico representa a densidade óptica no grupo experimental em relação ao controle, tomado como 100%. Valores apresentados como porcentagem da média da densidade óptica ± EPM.



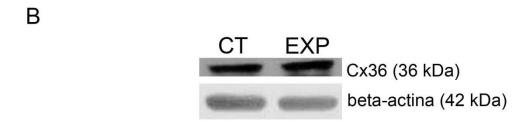


Figura 15 - Immunoblotting mostrando a expressão protéica da Cx36 no hipocampo de ratos durante o período crônico do modelo da pilocarpina. Os dados estão representados por bandas (B) e em média da razão entre a densidade óptica de bandas imunorreativas para Cx36 e da beta-actina (A). O gráfico representa a densidade óptica no grupo experimental em relação ao controle, tomado como 100%. Valores apresentados como porcentagem da média da densidade óptica ± EPM.

4.3 PCR EM TEMPO REAL

A eficiência dos *primers* utilizados foi entre 90% e 110%, valores considerados adequados de acordo com curvas-padrão realizadas a partir de uma série de diluições de cDNA e seus respectivos *slopes* (eficiência=10^(-1/slope) – 1). As curvas de dissociação (controle de amplificações inespecíficas) de todas as reações apresentaram pico único, indicando apenas um produto de PCR resultante em cada reação, mostrando amplificação específica.

Os dados obtidos referentes tanto à Cx43 quanto à Cx36 não demonstraram nenhuma diferença nos níveis do mRNA no hipocampo dos animais experimentais quando comparados aos controles (Figuras 16 e 17 e Tabela 2).

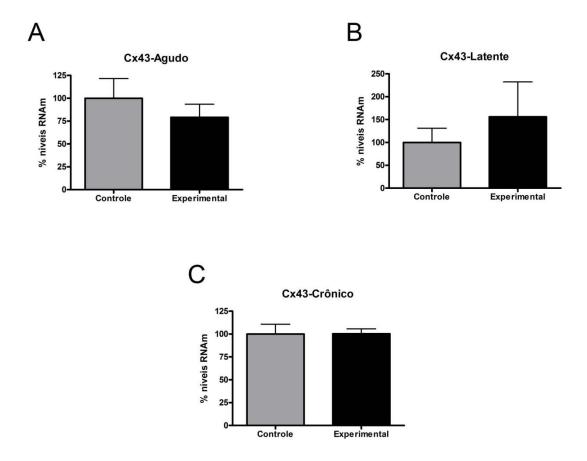


Figura 16 - Níveis de RNAm de Cx43 no hipocampo de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina avaliada por PCR em tempo real durante os períodos agudo (A), latente (B) e crônico (C). Valores apresentados em % em relação ao controle ± EPM.

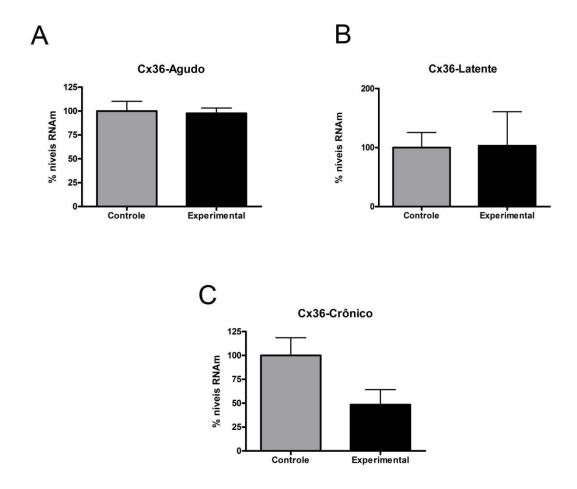


Figura 17 - Níveis de RNAm de Cx36 no hipocampo de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina avaliada por PCR em tempo real durante o período agudo (A), latente (B) e crônico (C). Valores apresentados em % em relação ao controle ± EPM.

Tabela 2 – Resumo dos resultados referentes à expressão proteica e de RNAm de Cx43 e Cx36 de acordo com os períodos avaliados.

	Immunoblotting			PCR em tempo real		
	Agudo	Latente	Crônico	Agudo	Latente	Crônico
Cx43		1	1			
Cx36						

4.4 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA DA ATIVIDADE EPILEPTIFORME – EFEITOS DA CBX SOBRE O SE INDUZIDO POR PILOCARPINA

Nesta etapa do estudo foram utilizados 52 animais. No entanto, 36 animais não foram utilizados devido a intercorrências que incluíram morte devido ao anestésico durante o procedimento cirúrgico para implante de eletrodos, registros contaminados com ruído ou ainda morte devido a complicações do SE.

Sendo assim, 16 animais tiveram eletrodos implantados na área cortical somestésica (A3) e foram utilizados para os experimentos propostos. Todos os animais utilizados apresentaram registro eletrocorticográfico de boa qualidade e os que apresentaram SE permaneceram neste estado por pelo menos 2 horas após aplicação de CBX ou salina, tempo estabelecido para que os animais fossem incluídos no protocolo. A composição dos grupos foi feita da

seguinte forma: 05 animais para o grupo controle CBX, 05 animais para o controle SE e 06 para o grupo experimental SE + CBX.

4.4.1 Observação de comportamentos

Os animais dos três grupos experimentais apresentaram comportamentos semelhantes durante os períodos de registro basal Imediatamente após serem colocados dentro da gaiola de Faraday, os ratos começaram a apresentar os comportamentos exploratórios, caracterizados por intensa movimentação. Os comportamentos exploratórios eram frequentes e duravam em média 30 minutos, período que era seguido por crescente quiescência. Os comportamentos se realizaram sob a forma de exploração visual, auditiva, olfativa e táctil (com as vibrissas). Ocasionalmente os animais empinavam para vasculhar sensorialmente as partes superiores da câmara. Outros comportamentos, como coçar-se e limpar-se, eram frequentes. O período de quiescência era interrompido para as aplicações de metilescopolamina, salina, pilocarpina e CBX, exceto quando os animais já estavam em SE, pois neste caso os animais já apresentavam comportamentos compatíveis com crises límbicas, descritas mais adiante.

4.4.2 Análise dos eletroscilogramas

Os registros dos períodos basais corresponderam geralmente a épocas de vigília (com ou sem atividade motora), nos quais os eletroscilogramas da A3 (área neocortical somestésica) apresentaram prevalência de potenciais que oscilaram nas frequências entre 5 e 11 Hz e entre 12 e 35 Hz, conhecidos

como ritmos teta e beta, respectivamente. Intrusão de ondas delta (frequências entre 0,5 e 4 Hz) também foi observada neste período

Grupo Controle CBX

A aplicação da CBX não produziu alterações significativas nos eletroscilogramas. Semelhante ao período basal, houve prevalência de potenciais com frequências oscilando entre 5 e 11Hz (teta) e 12 e 35Hz (beta), bem como ocorrência de ondas delta de baixa potência entre as ondas teta e beta. Não foram observadas alterações comportamentais motoras significativas nestes animais (Figuras 18, 21 e 24).

Em relação ao comportamento dos animais, nenhuma alteração foi observada após aplicação das substâncias utilizadas no protocolo.

A amplitude relativa dos períodos metil, salina e CBX não apresentou diferença significativa quando comparada ao período basal (Figura 29).

Grupo Controle SE

Não houve diferenças significativas entre os períodos basal e metil, comparados aos mesmos períodos do grupo controle CBX.

Por sua vez, a injeção de pilocarpina provocou intensas alterações eletrofisiológicas nas áreas corticais (Figura 19), desencadeando SE de longa duração. A evolução comportamental do SE foi qualitativamente semelhante, porém com diferenças de início de descargas anômalas (epileptógenas) e de tempo de aparecimento e "estabilização" do SE nos animais estudados. Nos primeiros 10 minutos após a injeção de pilocarpina, observou-se alternância de períodos de imobilidade com períodos de agitação e movimentação intensa.

Em geral, de 15 a 20 minutos após a injeção apareceram clonias de vibrissas e discretos abalos envolvendo principalmente face e tronco, concomitante com hiperventilação. Cerca de 10 a 25 minutos após, apareceram abalos repetitivos em patas anteriores, ainda alternando com períodos de quietude e/ou agitação. Geralmente, ocorreram crises tônico-clônicas generalizadas intensas, mas que regrediram espontaneamente alguns segundos depois, com subsequente início do SE. Os eletrocorticogramas apresentaram potenciais epileptiformes proeminentes e crescentes, com morfologia e frequência característicos de complexos espícula-onda, poliespículas e espículas isoladas (Figuras 25 e 26). Os potenciais mais precoces variaram mais; os tardios tenderam a se tornar semelhantes tanto em suas características de voltagem e frequência como em incidência e prevalência.

Cerca de 30 minutos após a administração da pilocarpina, 100% dos animais apresentaram SE, que se manteve em franco curso até a intervenção com CBX. Os potenciais se agrupavam, geralmente, em complexos espícula-onda (ondas lentas cavalgadas por espículas de pouco mais de 20 milissegundos). Os potenciais epileptiformes oscilaram nas mesmas bandas de frequência do período basal (frequências entre 5 e 11 Hz e entre 12 e 35 Hz, além de frequências mais lentas). No entanto, a banda de frequência mais alta (entre 15 e 30 Hz) passou a apresentar grande contribuição na composição do sinal, evidenciada pelos gráficos de densidade espectral e espectrograma (Figuras 22 e 24). A voltagem do sinal variou constantemente (Figura 29), ora com voltagem extremamente alta, em torno de 500 μV, ora com voltagem mais baixa, em torno de 100 - 150 μV.

Foi possível observar redução da amplitude do sinal, bem como da potência do componente de alta freqüência (15 - 30 Hz) apenas após 90 minutos (aproximadamente) do início do SE. (Figuras 29, 28 e 22). Além de redução da amplitude e da frequência, períodos *flat* (Figura 27) também foram observados nos ECoGs dos animais em SE a partir de aproximadamente 43 minutos após aplicação de salina (Figura 30).

A exceção de um animal que sobreviveu por 7 dias, recebendo cuidados adicionais, nenhum outro animal deste grupo sobreviveu por mais de 24 horas após indução do SE.

Grupo Experimental SE + CBX

Assim como observado no grupo controle SE, não houve diferenças significativas dos períodos basal e metil quando comparados com os mesmos estados do grupo Controle CBX. Além disto, ao compararmos o período SE do grupo experimental em relação ao SE do grupo controle SE, também não foi observada diferença significativa, indicando que os grupos estavam em condições semelhantes até a aplicação das substâncias (CBX ou salina, nos grupos experimental e controle SE, respectivamente) (Figura 29).

A CBX revelou-se uma substância com potencial para controle do SE, apresentando expressivos efeitos antiepileptiformes no modelo da pilocarpina. Injeção intraperitoneal de CBX (60 mg/kg) provocou alterações significativas no padrão de oscilação dos complexos espícula-onda imediatamente após sua administração (Figura 20). Os potenciais epileptiformes começaram a apresentar alterações na amplitude e na frequência logo nos primeiros cinco minutos após injeção de CBX, efeitos crescentes que perduraram durante o

período de registro. As mudanças no padrão de oscilação dos potenciais epileptiformes se tornaram evidentes 30 minutos pós-CBX, sendo que a voltagem e a frequência foram significativamente menores quando comparados ao período de SE pré-tratamento com CBX (Figura 20, 23, 24 e 29). Além da diminuição acentuada na frequência e na amplitude, os complexos espículaonda periodicamente mudaram sua morfologia alternando-se em complexos poli-espícula ou grupamentos de ondas lentas hiperssincrônicas, geralmente senoidais sem o componente espícula. Além disso, a análise do intervalo de tempo entre o início do SE e o momento em que começou a ocorrer redução de potência na banda de frequência entre 15 e 30 Hz, revelou diferença significativa (p<0,01) entre os grupos controle SE e experimental SE + CBX, sendo que o grupo controle passou a apresentar diminuição nessa banda de frequência após 5599 segundos do início do SE (correspondente a aproximadamente 63 minutos após aplicação de salina), enquanto o grupo tratado com CBX apresentou redução deste parâmetro após 3925 segundos do início do SE (ou aproximadamente 35 minutos após administração de CBX) (Figura 28).

Em relação à ocorrência dos períodos *flat*, foi possível observar que os animais que receberam CBX após indução do SE passaram a apresentá-los em média 476,7 segundos após a administração do bloqueador, tempo significativamente menor (p<0,01) em relação aos animais em SE que receberam salina ao invés de CBX (2565 segundos) (Figura 30).

Apesar das evidentes alterações eletrofisiológicas após administração de CBX nos animais em SE, não foi possível observar qualquer mudança, do ponto de vista comportamental, no padrão de crises que os animais

apresentavam, sendo impossível distingui-los daqueles que receberam salina ao invés de CBX. No entanto, um animal foi exceção em relação aos demais tratados com CBX, pois, aproximadamente 2 horas após a aplicação do bloqueador, este já não apresentava convulsões generalizadas, diferentemente dos demais, já que este aparentava não mais estar em SE. De fato, ao observarmos tanto o traçado quanto os gráficos de densidade espectral e espectrograma deste animal, foi possível constatar que a atividade elétrica já não era mais consistente com a de SE. Apesar disto, este animal sobreviveu apenas até o dia seguinte do experimento, assim como a maioria dos animais do grupo, que no geral não sobreviveu mais de 24 horas após indução do SE (bem como os animais do grupo controle SE). Contudo, dois animais do grupo experimental sobreviveram por meses, e foi possível constatar que ambos desenvolveram crises espontâneas e recorrentes, caracterizando o período crônico do modelo.

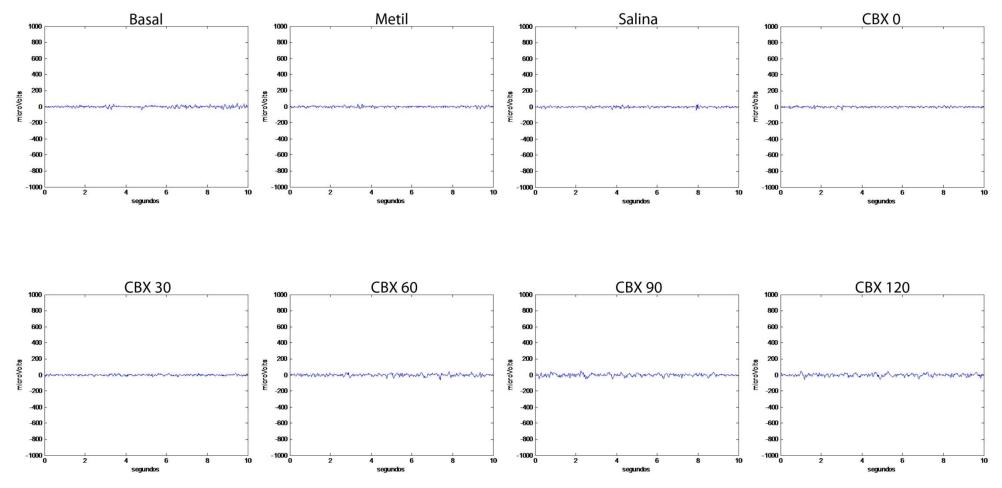


Figura 18 – Eletrocorticogramas representativos do grupo Controle CBX. Amostras de intervalos de 10 segundos de potenciais de campo da área cortical A3 durante período de vigília, mostrando a atividade elétrica basal inalterada após aplicação de metil-escopolamina, salina e em diferentes tempos após aplicação ip de CBX.

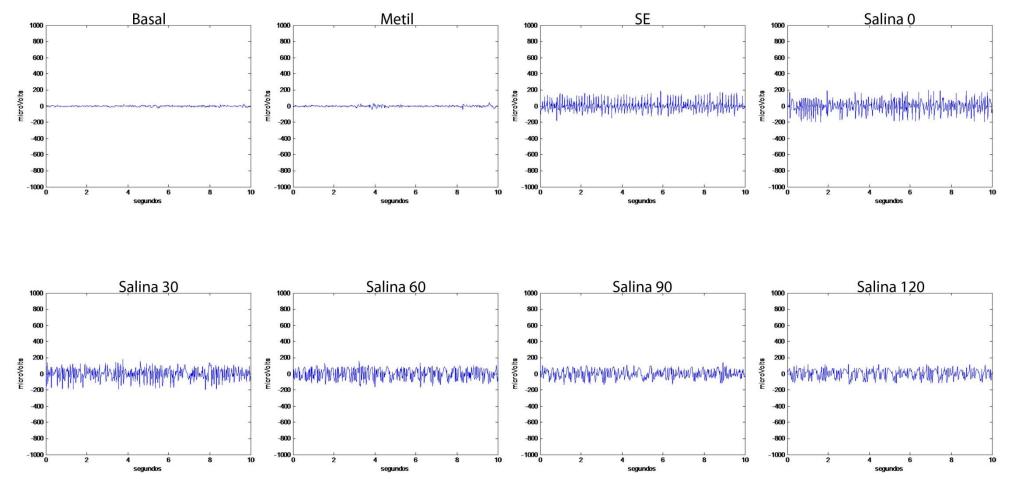


Figura 19 – Eletrocorticogramas representativos do grupo Controle SE. Amostras de intervalos de 10 segundos de potenciais de campo da área cortical A3 mostrando a atividade elétrica basal, que não se altera após aplicação de metil-escopolamina, e a atividade epileptiforme (SE) induzida por pilocarpina em diferentes tempos após aplicação ip de salina. Notar que a salina não provoca alterações significativas na amplitude e frequência da atividade epileptiforme durante os primeiros 60 minutos após sua aplicação. Após este período, pequenas mudanças passam a ser observadas, indicando o início do processo natural de extinção do SE.

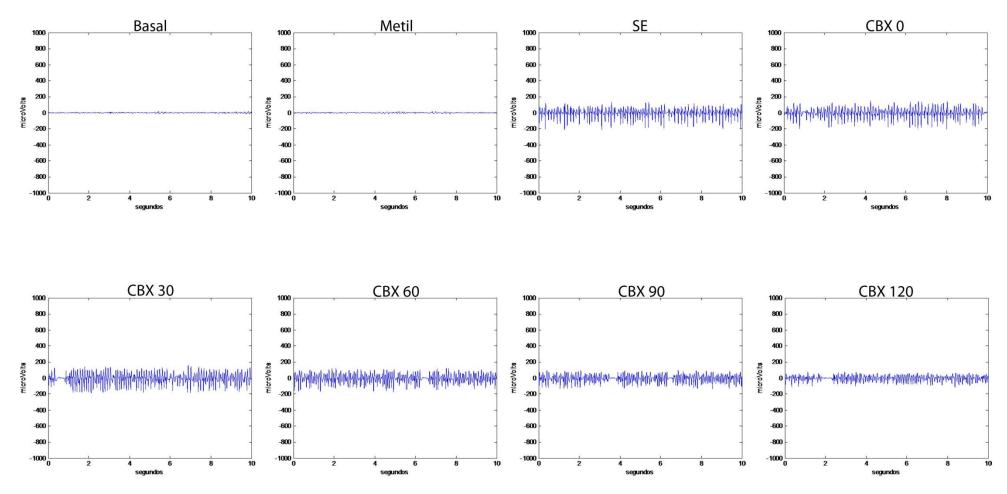


Figura 20 – Eletrocorticogramas representativos do grupo experimental SE + CBX. Amostras de intervalos de 10 segundos de potenciais de campo da área cortical A3 mostrando a atividade elétrica basal, que não se altera após aplicação de metil-escopolamina, a atividade epileptiforme (SE) induzida por pilocarpina e as alterações provocadas pela aplicação ip de CBX, avaliadas em diferentes tempos. Notar que a CBX produz alterações na amplitude e frequência da atividade epileptiforme, além de antecipar o surgimento dos períodos *flat*, já nos primeiros 30 minutos após sua administração, tornando-se mais evidentes com o passar do tempo.

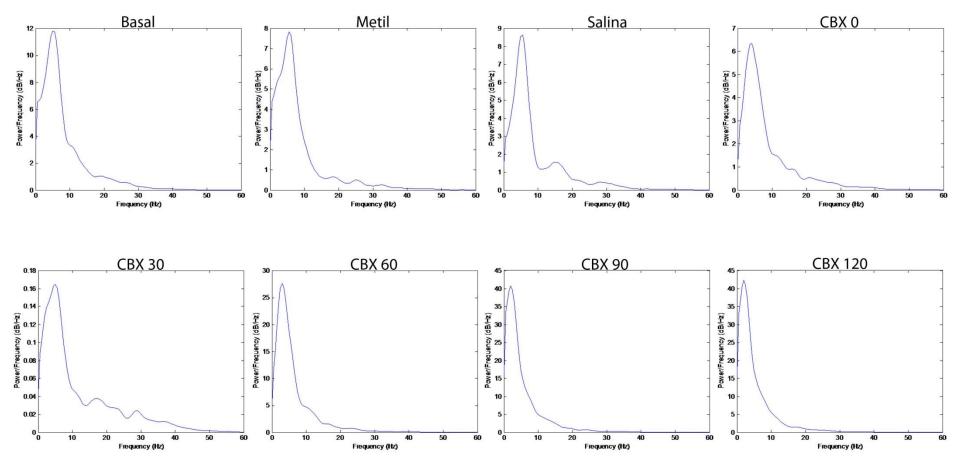


Figura 21 – Densidade espectral dos mesmos trechos dos eletrocorticogramas representativos do grupo Controle CBX. Os gráficos destacam as regiões de maior energia – maior concentração de frequências que compõem o sinal no intervalo de 10 segundos. Não houve diferença significativa entre os diversos períodos do grupo. Notar que, apesar da existência de potenciais que oscilam nas frequências do delta, teta e beta, há grande contribuição da frequência teta para a composição do sinal.

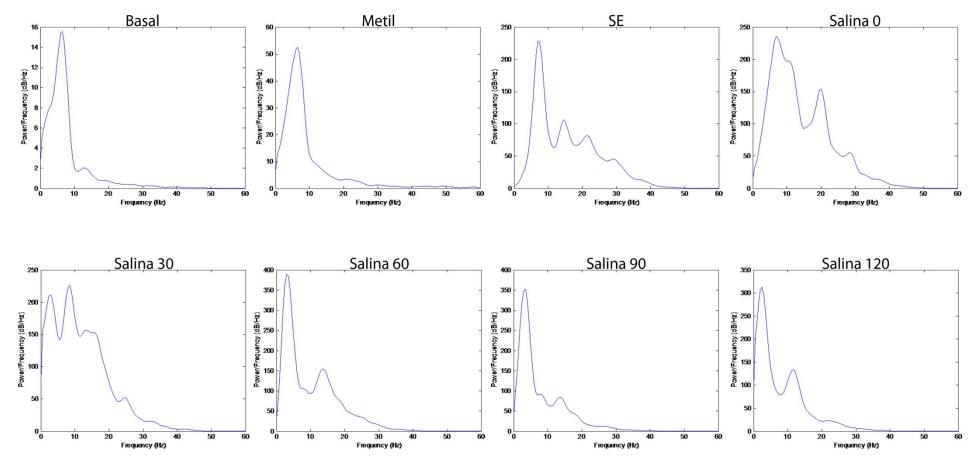


Figura 22 – Densidade espectral dos mesmos trechos dos eletrocorticogramas representativos do grupo Controle SE. Os gráficos destacam as regiões de maior energia – maior concentração de frequências que compõem o sinal no intervalo de 10 segundos. Não há diferença entre os períodos basal e metil, porém a indução de SE gera aumento da potência de todas as bandas de frequências, especialmente entre 15 e 30 Hz. Administração de salina após 30 minutos de SE não altera o perfil dos gráficos, que passa a sofrer mudanças apenas após 60 minutos da aplicação de salina (correspondente a 90 minutos de SE), indicando possível início do processo natural de extinção do SE, apesar da manutenção da alta potência das oscilações.

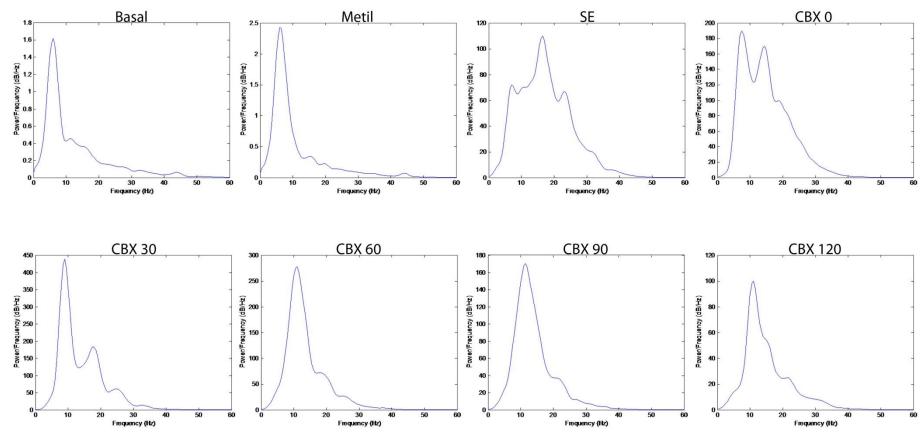


Figura 23 – Densidade espectral dos mesmos trechos dos eletrocorticogramas representativos do grupo experimental SE + CBX. Os gráficos destacam as regiões de maior energia – maior concentração de frequências que compõem o sinal no intervalo de 10 segundos. Não há diferença entre os períodos basal e metil, porém a indução de SE gera aumento da potência de todas as faixas de frequências, especialmente entre 15 e 30 Hz. Administração de CBX após 30 minutos de SE provocou alteração do perfil de contribuição das frequências, com destaque para redução da potência de potenciais entre 15 e 30 Hz.

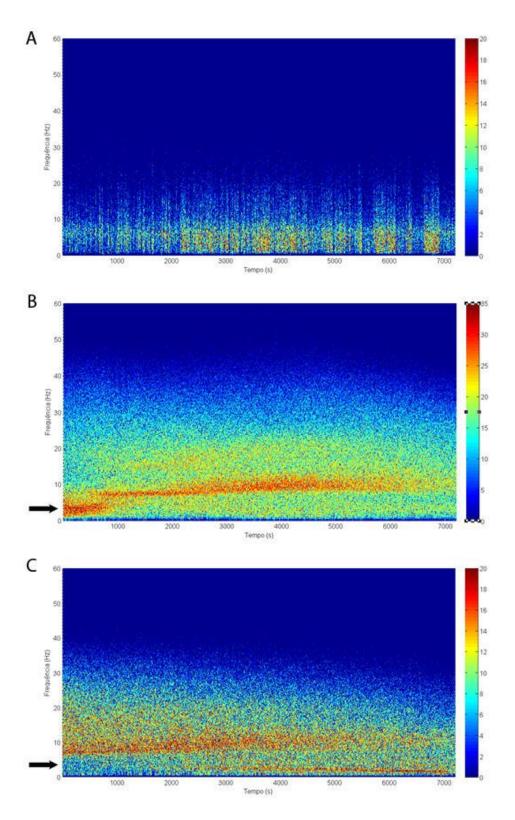


Figura 24 – Espectrogramas relativos aos grupos controle CBX (A), controle SE (B) e experimental SE+CBX (C). Os espectrogramas mostram as principais frequências, evidenciadas pela intensidade de cores, que compõem o sinal no intervalo de 2 horas após aplicação de CBX (A e C) e salina (B). A seta em C exemplifica a redução da intensidade de cores, após aplicação de CBX, em relação ao mesmo intervalo de tempo em B (seta).

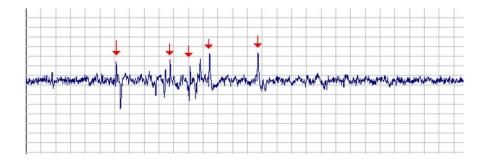


Figura 25 – Trecho de eletrocorticograma de um animal que recebeu pilocarpina mas ainda não apresentava SE, mostrando a presença de espículas isoladas (setas). Calibração: 20 μV, 1 segundo.

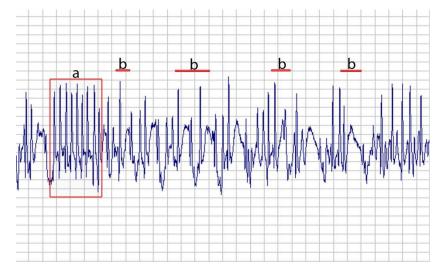


Figura 26 – Trecho de eletrocorticograma de um animal em SE, destacando poliespículas (a) e complexos espícula-onda (b), característicos de atividade epileptiforme. Calibração: 20 μV, 1 segundo.

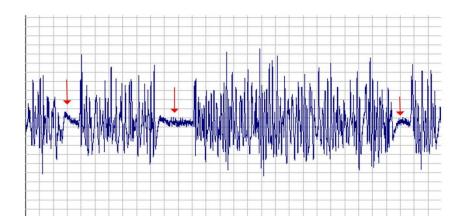


Figura 27 – Trecho de eletrocorticograma de um animal em SE, destacando os períodos *flat* (setas). Calibração: 20 μV, 1 segundo.

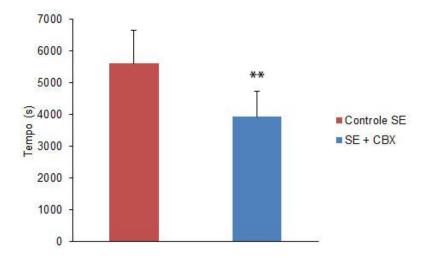


Figura 28 - Intervalo de tempo entre o início do SE e a redução da potência da banda de frequência entre 15 e 30 Hz nos grupos controle SE e experimental SE + CBX. Dados apresentados em média ± DP. **p<0,01 (teste t de Student não-pareado).

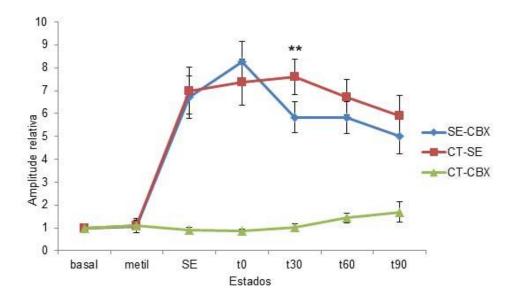
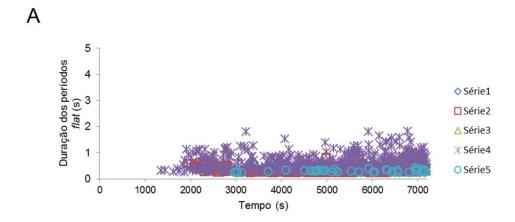
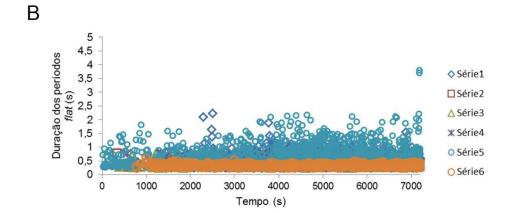


Figura 29 - Amplitude relativa ao basal de cada grupo, indicando que não houve diferença significativa entre os períodos do grupo controle CBX, além dos períodos basal e metil dos grupos controle SE e experimental SE + CBX. O período de SE dos grupos controle SE e experimental SE + CBX também não apresentou diferença entre eles, indicando que os grupos apresentavam períodos semelhantes até a aplicação de CBX ou salina. Observa-se em t30 (30 minutos após administração de salina ou CBX nos grupos CT-SE e SE+CBX, respectivamente), que houve redução significativa da amplitude relativa do grupo experimental (azul) em relação ao CT-SE. Dados apresentados como média±DP. **p≤0,01 (teste t de Student não-pareado).





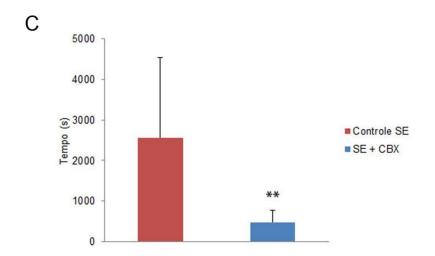


Figura 30 – Distribuição dos períodos flat dos animais do grupo controle SE (A) e do grupo SE+CBX (B) em função do tempo. Notar que houve antecipação significativa (C) do surgimento destes períodos nos animais do grupo SE+CBX em relação aos do grupo controle SE, após aplicação de CBX e salina, respectivamente. Não houve diferença significativa tanto na duração quanto no número destes períodos (A e B). O gráfico representa média ± DP. **p<0,01 (teste t de Student não-pareado). Cada série (A e B) representa um animal de cada grupo.</p>

5 DISCUSSÃO

Os canais de JC são contatos intercelulares que facilitam a homeostase iônica e a sincronização de potenciais de ação no sistema nervoso (Dermietzel, 1996; Perez-Velázquez e Carlen, 2000), podendo estar envolvidos também com a geração e a generalização de crises epilépticas (Perez-Velazquez e Carlen, 2000; Carlen et al., 2000; Kohling et al., 2001; Traub et al., 2001^a; Traub, 2003). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis de expressão proteica e de RNAm de Cx (subunidades que compõem os canais de JC) no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de ELT induzido por pilocarpina.

5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE Cx43

Já está bem descrito que a Cx43 é expressa, no sistema nervoso central, principalmente em astrócitos (Dermietzel e Spray, 1993), e que estes são extensivamente acoplados por canais formados por essa proteína nas JC. Sendo assim, as JC desempenham um importante papel em várias funções dos astrócitos, como troca de substâncias de baixo peso molecular, controle da homeostase extracelular de íons potássio e transferência de sinais entre as células gliais (Giaume et al., 1991; Nagy e Rash, 2000).

A análise da expressão da Cx43 por *immunoblotting* demonstrou a presença desta proteína no hipocampo de ratos, conforme já descrito na literatura (Söhl et al., 2000; Nagy e Rash, 2000; Söhl et al., 2005).

Os dados obtidos por *immunoblotting* indicam que não houve alteração na expressão de Cx43 no hipocampo de ratos submetidos ao SE e avaliados

no período agudo do modelo da pilocarpina. Já os animais do grupo latente sofreram redução da expressão desta proteína, enquanto os animais do grupo crônico apresentaram aumento da expressão da mesma, quando comparados aos seus respectivos controles.

As discussões sobre o possível papel desses canais após lesão no sistema nervoso central giram em torno de duas hipóteses: uma que considera que esses canais possam desempenhar um papel neuroprotetor, e a outra que acredita nos efeitos nocivos desempenhados por esses canais nessas situações.

Nossos resultados apontam para uma regulação positiva da expressão da Cx43 em animais epilépticos (grupo crônico), sugerindo um aumento do acoplamento entre astrócitos, que por sua vez pode ter um papel importante na fisiopatologia da epilepsia. De acordo com Kumaria et al. (2008), as ondas de cálcio interastrocitárias podem ser o evento inicial das crises epilépticas, pois elas poderiam, teoricamente, levar a hiperexcitabilidade neuronal de um grupo de neurônios ativados a outro grupo não ativado inicialmente. Dessa maneira, o segundo grupo neuronal dispararia potenciais de ação de forma sincronizada no tempo e no espaço com o primeiro grupo de neurônios, que é a base neurofisiológica da atividade epileptiforme. Além disso, as ondas de cálcio medeiam a excitabilidade astrocitária, que é um fator decisivo anterior à liberação de glutamato pelos astrócitos, que por sua vez irá se ligar a receptores nos neurônios para produzir potenciais excitatórios pós-sinápticos.

Sabe-se que elevações nos níveis de cálcio intracelulares propagam-se entre os astrócitos como ondas de cálcio (Charles et al., 1991; Cornell-Bell et al., 1990; Nedergaard, 1994) e que são responsáveis por várias funções como

crescimento, diferenciação e liberação de mediadores (Vernadakis, 1996; Scemes e Giaume, 2006). Um dos mecanismos propostos para explicar a transmissão das ondas de cálcio entre os astrócitos é via JC, descrita inicialmente por Finkbeiner (1992). Nesse estudo foi mostrado que a propagação das ondas de cálcio entre astrócitos foi prejudicada ao se bloquear os canais de JC, corroborando com a idéia de que esses canais possuem um papel crucial na transmissão de sinais de Ca²⁺ entre astrócitos.

Além dos canais de JC, o ATP liberado pelos astrócitos em decorrência da propagação das ondas de cálcio também desempenha uma importante função na propagação das mesmas, e esse fenômeno é facilitado pela presença das JC permeáveis ao cálcio (Hassinger et al., 1996; Guthrie et al., 1999). Foi demonstrado por Cotrina et al. (1998) que ondas de cálcio podem ser geradas com a aplicação de ATP, que atua em receptores P2, e o bloqueio desses receptores atenua essas ondas de cálcio. Outra evidência da participação do ATP na transmissão das ondas de cálcio foi dada por Gallagher e Salter (2003), que mostraram que tanto o receptor P2Y1 quanto o receptor P2Y2 são necessários para a propagação das ondas de cálcio.

Sendo assim, um possível aumento do acoplamento entre astrócitos, evidenciado pelo aumento da expressão da Cx43, poderia contribuir para o envolvimento de vários grupos neuronais na circuitaria das crises epilépticas, podendo, até mesmo, levar a um quadro de generalização das mesmas, como foi sugerido por Fonseca et al. (2002). Além disso, a extensão da lesão poderia ser refletida nessas outras regiões ativadas secundariamente, o que facilitaria a progressão da epilepsia do lobo temporal para crises mais generalizadas. Ainda, Gajda et al. (2003), utilizando o modelo de epilepsia focal induzida pela

aplicação cortical de 4-aminopiridina (4-AP), reportaram aumento nos níveis de RNAm de Cx43 após repetidas crises, e esses autores sugerem que os canais de JC podem contribuir para a atividade ictal, aumentando a duração das crises, a amplitude das descargas epilépticas e promovendo a epileptogênese.

Um aumento do acoplamento entre astrócitos de tecidos retirados de pacientes com epilepsia também foi evidenciado por Lee et al. (1995). Esses autores mostraram, com a técnica de recuperação de fluorescência após exposição excessiva à fonte de luz emissora (*Fluorescence Recovery After Photobleach* - FRAP), que astrócitos cultivados retirados do foco epiléptico apresentam aumento funcional do acoplamento entre essas células, o que está de acordo com dados obtidos por Naus et al. (1991) e Fonseca et al. (2002), que reportaram níveis elevados na expressão da Cx43 em astrócitos de tecidos epilépticos.

Apesar da existência de várias evidências na literatura (como citado anteriormente) de que o aumento entre o acoplamento astrocitário pode promover crises epilépticas, o significado e a relação entre o acoplamento via canais de JC entre astrócitos na epilesia é controverso e complexo. Enquanto o acoplamento entre astrócitos pode contribuir para a epileptogênese e manutenção das crises através da sincronização da atividade neuronal via ondas de cálcio gliais e outros sinais intracelulares propagados entre os astrócitos, esse mesmo acoplamento astrocitário pode inibir a excitabilidade neuronal e as crises através do tamponamento de potássio extracelular (Steinhauser e Seifert, 2002; Samoilova et al., 2008), papel sabidamente desempenhado pelos astrócitos (Kofuji e Newman, 2004). Além disso, uma vez que essas condições resultam no acúmulo de metabólitos como Ca²⁺ e

glutamato, fatores envolvidos na excitotoxicidade (Perez Velazquez et al., 2003), o aumento na comunicação intercelular via canais de JC poderia permitir a passagem desses fatores para as células vizinhas não afetadas pela lesão, sendo que esse tamponamento de metabólitos tóxicos pelas células saudáveis preveniria a morte das células que inicialmente sofreram danos (et al., 2010). Outra visão positiva em relação ao aumento do acoplamento astrocitário em condições de lesão leva em consideração o fato de que essas células podem secretar vários fatores neurotróficos e citocinas que poderiam estimular a sobrevivência dos neurônios e protegê-los contra a excitotoxicidade, estresse oxidativo e metabólitos (Chew et al., 2010).

Ao contrário dos resultados referentes à expressão de Cx43 no período crônico, os animais avaliados no período latente apresentaram redução significativa da expressão de Cx43 no hipocampo.

De acordo com Chew et al. (2010), há várias evidências de que o papel da Cx43 pode variar conforme a progressão da lesão, sugerindo a existência de uma janela crítica na qual os canais de JC e hemicanais podem atuar interferindo na lesão. Nesse sentido, um estudo realizado por Ding et al. (2007) mostrou que após SE induzido por pilocarpina, o período em que foi possível constatar aumento de Ca²⁺ astrocitário (3 dias) se correlaciona com o período em que ocorreu a morte neuronal tardia no modelo. Sendo assim, esses autores sugerem, por meio de experimentos que atenuam os níveis de Ca²⁺ astrocitário e por meio do bloqueio de receptores NMDA, que a liberação de glutamato pelos astrócitos devido ao aumento do Ca²⁺ leva à ativação de receptores do tipo NMDA que por sua vez poderia ativar a cascata que culmina em morte celular. Os animais utilizados aqui para o estudo do período latente

foram sacrificados 3 dias após indução do SE, mesmo período em que Ding et al. descrevem a morte neuronal "tardia". Sendo assim, a redução da expressão de Cx43 em nossos animais, sugerindo redução nos níveis de acoplamento entre astrócitos, poderia ser interpretada como uma tentativa de neuroproteção, uma vez que o possível desacoplamento astrocitário impediria a transmissão de ondas de Ca²⁺ e consequentemente a morte neuronal por excitotoxicidade devido à liberação de glutamato.

Resultados apontando para a mesma direção foram obtidos em um trabalho que utililizou um modelo de atividade epileptiforme induzido por bicuculina (antagonista de receptores GABAA) em fatias hipocampais (Yoon et al., 2010). Os autores fizeram uma série de experimentos para avaliar se os canais de JC entre astrócitos contribuem para a extensão da lesão e para a severidade da morte celular após atividade epileptiforme. Utilizando um peptídeo mimético (pequenos peptídeos sintéticos correspondentes a sequências selecionadas de Cx, utilizadas para estudar funções celulares especificamente relacionadas a essas proteínas – Samoilova et al., 2008) que bloqueia Cx43, esse trabalho demonstrou que estes canais parecem ser essenciais para a sobrevivência do tecido durante o evento epileptiforme. No entanto, após esse período, esses canais desempenhariam um papel crucial na extensão da lesão neuronal.

Em relação ao período agudo, não foi observada nenhuma alteração na expressão de Cx43 no hipocampo dos animais experimentais em relação aos controles. Os níveis de mRNA de Cx43 também não foram modificados após SE.

Söhl et al. (2000) e Beheshti et al. (2010), utilizando os modelos do ácido caínico e o *kindling*, também não encontraram diferenças na expressão da Cx43 no hipocampo dos animais submetidos a esses dois modelos de ELT. Além disso, nenhuma diferença nos níveis de RNAm foi reportada para Cx43 também, apesar da astrogliose observada, principalmente nos animais submetidos ao tratamento com ácido caínico. No entanto, de acordo com Söhl et al., mesmo pequenas alterações da expressão de Cx43 podem significar desajustes na comunicação entre astrócitos, o que poderia levar, por exemplo, a um desajuste no tamponamento de potássio extracelular, podendo acarretar em predisposição para hiperexcitabiliade neuronal e crises (Janigro et al., 1997; Bordey e Sontheimer, 1998; Gabriel et al., 1998^{a,b}; Xiong e Stringer, 1999; Hinterkeuser et al., 2000; Xu et al., 2009). Por outro lado, como já citado, esse desacoplamento também pode significar uma tentativa de proteção das células, uma vez que o excesso de sinais elétricos não se propagaria de forma generalizada.

Ao contrário do que foi observado nos níveis proteicos de Cx43 nos períodos crônico e latente, não foi detectada modulação significativa do RNAm de Cx43 no hipocampo dos animais avaliados durante esses mesmos períodos. No entanto, alterações pós-transcricionais, como regulação da síntese e/ou transporte intracelular para sítios da membrana, bem como acúmulo da proteína devido ao aumento da estabilidade da mesma e/ou redução da degradação proteica podem ter ocorrido, explicando essa falta de correlação entre os níveis de RNAm e proteico de Cx43 (Caltabiano et al., 2010).

5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE Cx36

A análise da expressão de Cx36 por *immunoblotting* detectou sua presença no hipocampo de ratos, como já descrito na literatura (Condorelli et al., 1998, 2003; Sohl et al., 2000). Há vários trabalhos reportando que a Cx36 é expressa em neurônios, principalmente em interneurônios (Condorelli et al., 1998, 2003; Deans et al., 2001; Gibson et al., 2005), sendo a principal conexina expressa em neurônios adultos, além de ter sido ligada a uma forma de epilepsia conhecida como epilepsia mioclônica juvenil (Belluardo et al., 2000; Mas et al., 2004).

Não foi observada modulação significativa de Cx36 em nenhum dos períodos avaliados no presente estudo, tanto no que se refere aos níveis proteicos quanto de RNAm.

Vários trabalhos analisaram a expressão de Cx36 em tecidos de pacientes com epilepsia e em diferentes modelos animais de epilepsia. Aronica et al. (2001) mostraram aumento dos níveis de RNAm em tecido de pacientes, enquanto Collignon et al. (2006) reportaram preservação da proteína em regiões hipocampais de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial. Após injeção intracerebroventricular de ácido caínico, progressiva modulação negativa do RNAm de Cx36 foi detectada nas regiões CA3 e hilo de ratos, de acordo com Condorelli et al. (2003). Sohl et al. (2000), avaliando a expressão de Cx36 nos modelos de *kindling* e ácido caínico, observaram redução tanto dos níveis de RNAm quanto de proteína no hipocampo de ratos 2 a 3 semanas após a última crise produzida pelo abrasamento. No entanto, não houve alterações proteicas e nem de RNAm nos animais avaliados 4 a 6 semanas

após a última crise. Já os animais submetidos à injeção de ácido caínico e analisados 30 dias após a indução das crises, apresentaram redução apenas de RNAm, sem alterações dos níveis proteicos, concordando parcialmente com nossos achados. Talvez essas diferenças no que se refere aos níveis de RNAm e de níveis proteicos de Cx36 possam ser atribuídas a variações nas preparações usadas, métodos de indução de crises, duração da atividade ictal, tempo em que foi realizada a análise e diferentes regiões do encéfalo avaliadas (McCracken e Roberts, 2006).

De acordo com Beheshti et al. (2010), aumento tanto nos níveis proteicos quanto de RNAm de Cx36 no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de *kindling* foi encontrado apenas durante a aquisição de crises focais (ratos que atingiram a escala 2 de Racine, *partially kindled*). Os autores sugerem que o aumento de Cx36 nos canais de junções comunicantes do hipocampo entre os neurônios piramidais de CA3 ou entre interneurônios GABAérgicos eleva a capacidade desses canais de sincronizar a atividade elétrica, facilitando a indução de crises focais nos estágios iniciais do modelo de *kindling*. Assim sendo, nesse trabalho é evidenciada a importância da Cx36 como um alvo para modificar o processo epileptogênico. No entanto, após a aquisição de crises secundariamente generalizadas (ratos que atingiram a escala 5 de Racine, *fully kindled*), os níveis de Cx36 quase retornaram ao estado basal, concordando com nossos achados referentes ao período crônico do modelo de pilocarpina.

Ao contrário da hipótese acima descrita, vários trabalhos têm demonstrado que a ausência de Cx36 pode aumentar a chance de ocorrência de crises. Pais et al. (2003), usando fatias de hipocampo de camundongos

knockout para Cx36, encontraram aumento de descargas interictais quando comparados aos animais wild type. Também foi demonstrado que o desacoplamento de interneurônios inibitórios leva a efeitos excitatórios secundários em células piramidais (Yang et al., 2007). Jacobson e utilizando camundongos colaboradores (2010), knockout para Cx36, reportaram maior suscetibilidade à ocorrência de crises tônico-clônicas generalizadas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), em contraste com a ideia de que o bloqueio de canais de junções comunicantes protege contra crises epilépticas. Beaumont e Maccaferri (2011), utilizando o modelo de 4-AP in vitro, relataram que a Cx36 não é crítica para a geração de descargas epileptiformes em circuitarias GABAérgicas, e que os efeitos antiepilépticos da CBX dependem provavelmente de um bloqueio de receptores GABAA e não do bloqueio de canais de junções comunicantes compostos por Cx36. No entanto, os autores comentam que efeitos diferentes aos evidenciados por eles podem ser encontrados em outras situações, como no uso de outras espécies, por (no trabalho de Beaumont e Maccaferri foram exemplo utilizados camundongos). Além disso, é importante salientar que a utilização de outros modelos de epilepsia também podem gerar outros resultados.

Existe a possibilidade de que as funções dos canais de junções comunicantes estejam alteradas em condições como epilepsia, mesmo quando não há alterações da expressão de Cx (Söhl et al., 2000), como foi observado em nossa análise de Cx36 em nossos animais. Apesar de não termos evidenciado diferenças na expressão proteica e de RNAm de Cx36 nos animais submetidos à aplicação de pilocarpina, é possível que haja participação dessa proteína na sincronização das descargas epileptiformes, já que alterações na

permeabilidade dos canais que as expressam podem ocorrer, independente da quantidade de proteína expressa. Nesse sentido, de acordo com González-Nieto et al. (2008), canais formados por Cx36 não se fecham frente à acidose, e os neurônios que expressam Cx36 permanecem acoplados mesmo quando pH_i cai, como ocorre durante um episódio de crises tônico-clônicas generalizadas ou SE (Sasahira et al., 1997).

Além disso, o simples fato de não termos observado mudanças significativas na expressão de Cx36 pode representar participação dessa proteína na sincronização e geração da atividade epileptiforme, como foi sugerido por Collignon et al. (2006), que encontraram níveis proteicos preservados de Cx36 em tecidos retirados de pacientes com ELT.

Apesar da existência de dados controversos no que se refere ao papel das Cx na epilepsia, de modo geral parece haver envolvimento dessas proteínas e os canais/hemicanais formados por elas na ELT.

5.3 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA DA ATIVIDADE EPILEPTIFORME – EFEITOS DA CBX SOBRE O SE INDUZIDO POR PILOCARPINA

Com o objetivo de se caracterizarem os efeitos da CBX sobre os eventos epileptiformes e demonstrar o possível envolvimento dos canais de JC durante o SE, propusemo-nos a avaliar, no modelo experimental de epilepsia do lobo temporal, a atividade comportamental e eletroscilográfica de ratos submetidos a SE induzido por injeção sistêmica de pilocarpina.

Nossos resultados mostraram que a aplicação sistêmica de CBX produziu expressivos efeitos antiepileptogênicos e revelou-se uma substância com potencial para controle do SE induzido por pilocarpina. Os potenciais epileptiformes tiveram alterações na amplitude e na frequência logo nos primeiros cinco minutos após injeção de CBX, efeitos crescentes que perduraram por todo o período do experimento. Além disto, os complexos espícula-onda, característicos de atividade epileptiforme, tiveram sua morfologia alterada após a aplicação de CBX.

Existem na literatura várias evidências dos efeitos anticonvulsivantes dos bloqueadores dos canais de JC baseadas em modelos de atividade epileptiforme *in vitro*, como por exemplo, os modelos de atividade epileptiforme induzidos por 0-Ca²⁺ (Perez-Velázquez et al., 1994) ou 0-Mg²⁺ (Margineau e Klitgaard, 2001), exposição a 4-AP (Perreauly e Avoli, 1992; Ross et al., 2000; Traub et al., 2001^a), exposição prolongada a antagonistas de GABA_B (Uusisaari et al., 2002) ou tetanização da via colateral de Schaffer em fatias hipocampais de encéfalos ratos (Jahromi et al., 2002). Além disso, bloqueadores de JC levam a redução de disparos sincronizados de interneurônios inibitórios hipocampais (Traub et al., 2001^b; Yang e Michelson, 2001), que podem ter um papel importante na indução de descargas epileptiformes (Avoli, 1996; Traub et al., 2001^b), como já discutido anteriormente.

Estudos em modelos *in vivo* também têm demonstrado a ação anticonvulsivante desses compostos, como já foi relatado por Medina-Ceja et al. (2008), por exemplo, que observaram que a aplicação de CBX no córtex entorrinal de ratos com crises induzidas por 4-AP não só diminuiu a amplitude e a frequência das descargas epileptiformes como também bloqueou

completamente a atividade ictal tanto no córtex entorrinal quanto na região CA1. Esses autores sugerem que essa ação da CBX pode ocorrer devido ao desacoplamento entre interneurônios GABAérgicos, que desempenham um importante papel na hiperssincronização da atividade epileptiforme nesse modelo. Szente et al. (2002) e Gajda et al. (2003) também demonstraram envolvimento do acoplamento elétrico no modelo induzido por 4-AP, através da observação de que o bloqueio desses canais com CBX diminuiu a duração das crises e também a amplitude das descargas epilépticas, enquanto a aplicação de trimetilamina (TMA - abridor desses canais) aumentou a duração e amplitude das mesmas.

Outros modelos de epilepsia *in vivo* também fizeram uso da CBX e constataram efeitos anticonvulsivantes, como foi o caso de Gareri et al. (2004^a), utilizando ratos geneticamente propensos a epilepsia (GEPR), e Bostanci e Bagirici (2007), utilizando o modelo de epilepsia induzido pela aplicação de penicilina. Como no caso dos estudos em modelos *in vitro* citados, esses últimos autores verificaram diminuição da frequência e da amplitude das descargas epilépticas, além de atenuação do comportamento epiléptico.

Sendo assim, há vários trabalhos que corroboram os nossos resultados referentes ao tratamento com CBX, evidenciando o importante papel dos canais de JC na indução e manutenção da atividade epileptiforme. As diferenças entre esses trabalhos estão nas concentrações utilizadas, vias de administração e intensidade dos efeitos anticonvulsivantes, sendo que essas três variáveis estão intimamente correlacionadas. Além disso, não havia evidências de estudos que avaliem os efeitos de agentes que atuam em canais de JC no modelo da pilocarpina.

Foi possível observar que a CBX foi capaz de promover redução da potência na faixa de frequência entre 15 - 30 Hz antecipadamente no grupo SE + CBX em relação ao grupo tratado com salina ao invés do bloqueador. De acordo com Lehmkuhle et al. (2009), oscilações na banda do "high" beta e do "low" gama (20-70Hz) são observadas durante crises, e essa banda de frequência possui potência dinâmica no EEG durante SE eletrográfico. Os resultados obtidos não nos permitem inferir sobre a dinâmica de frequências acima de 35 Hz ("low" gama), uma vez que os sinais foram filtrados em 35 Hz, porém foi possível verificar em nossos animais que oscilações entre 15-30 Hz têm grande contribuição na composição do sinal durante o período de SE, concordando com Lehmkuhle et al. (2009). Outros autores também identificaram essa faixa de frequência durante crises, como Steriade e Contreras (1998), que após indução de crises pela aplicação de bicuculina, relataram complexos espícula-onda e poliespícula-onda com disparos nas faixas de frequência entre 2-4 Hz e 10-15 Hz. Além das evidências acima citadas mostrando a ocorrência de oscilações na banda do beta e do gama na atividade epileptiforme, Pascual-Leone et al. (1992) mostraram que estimulação magnética repetitiva do córtex motor na faixa entre 10-20 Hz provocou crises em humanos sadios.

Em um trabalho desenvolvido por Yamawaki et al. (2008) foi relatado que fatias de córtex motor primário de ratos apresentam oscilações na banda do "high" beta (25-30 Hz) após aplicação de ácido caínico e carbacol às fatias. Estes autores também demonstraram bloqueio destas oscilações após exposição das fatias ao bloqueador de JC CBX, sugerindo um importante papel para o acoplamento neuronal via canais de JC na atividade oscilatória na

frequência do beta. Nossos resultados também apontam relação entre as JC e as oscilações na faixa de frequência do beta, uma vez que a CBX promoveu redução da potência nesta faixa nos animais em SE. De fato, de acordo com Traub e Whittington (2010), oscilações na banda de frequência do beta, além de outros tipos de oscilações rápidas, como as *very fast oscillations*, pode ser precursoras, ou ainda participar das crises epilépticas, e estas oscilações também dependem dos canais de JC.

A CBX é um derivado do ácido glicirretínico que se liga e bloqueia um amplo espectro de Cx que compõem os canais de JC. O modo de ação de agentes que modulam esses canais ainda não é bem conhecido, inclusive o da CBX (Gladwell e Jefferys, 2001). No entanto, acredita-se que os derivados do ácido glicirretínico se ligam diretamente às moléculas de Cx, causando alteração conformacional que leva ao fechamento dos canais de JC (Davidson e Baumgarter, 1988), sendo que este mecanismo está de acordo com dados prévios de Davidson et al. (1986), que mostraram rápida reversão do bloqueio destes canais após lavagem das células com meio contendo albumina. Além desta hipótese, a ação da CBX sobre os canais de JC pode envolver a capacidade desta substância em promover desfosforilação da Cx43, como foi mostrado em células epiteliais de fígado de rato (Guan et al., 1996). Estes autores mostraram que o desacoplamento promovido pelo ácido glicirretínico 18-beta correlacionou-se com redução da forma fosforilada P2 da Cx43 e aumento da forma não fosforilada da proteína (já é conhecido que o estado de fosforilação da Cx43 pode alterar a condutância do canal, sendo que as formas fosforiladas normalmente estão relacionadas com aumento da probabilidade do canal se encontrar no estado aberto - Godwin et al., 1993; Oelze et al., 1995; Cotrina et al., 1998). No entanto, além da Cx43, a CBX também inibe canais de JC compostos por outras Cx (Lan et al., 2011).

Por ser lipofílico, esse composto penetra facilmente no encéfalo após administração sistêmica (Jellinck et al., 1993; Dobbins e Saul, 2000). Apesar de a CBX ser um agonista mineralocorticóide devido à sua capacidade de inibição da enzima 11-β- hidroxiesteróide (aumentando desse modo os hormônios glicocorticóides), há estudos comprovando que os efeitos anticonvulsivantes observados após aplicação desse composto não estão relacionados com sua interação com receptores mineralocorticóides, e sim com a capacidade da CBX de atuar nos canais de JC (Ross et al., 2000; Gigout et al., 2006^a).

Quando aplicada nos animais do grupo controle CBX, a CBX não alterou a atividade eletrocorticográfica basal (amplitude relativa do sinal não foi alterada, assim como contribuição das frequências), bem como não produziu mudanças no comportamento dos animais, resultados semelhantes aos encontrados por Medina-Ceja et al. (2008), Gigout et al. (2006ª) e Gajda et al. (2003). De fato, já foi demonstrado que vários bloqueadores de canais de JC, inclusive a CBX, não alteram as propriedades eletrofisiológicas de neurônios do neocórtex de humanos (Gigout et al., 2006ª), hipocampo de ratos (Kohling et al., 2001) e de fatias tálamo-corticais (Gigout et al., 2006b).

Foi possível observar em nossos resultados que os efeitos da CBX foram progressivos durante o tempo avaliado, e ao final de 2 horas estes efeitos ainda foram mantidos, apesar de não termos observado regressão comportamental do SE e os animais terem morrido no intervalo de 48 horas após indução do SE, demonstrando que a CBX não foi eficaz em promover a recuperação dos animais ao seu estado basal, com exceção de um animal. No

entanto, temos que levar em consideração que a CBX foi administrada sistemicamente, diferente dos trabalhos que evidenciaram a interrupção das crises após o tratamento, em que a CBX foi aplicada diretamente no foco epiléptico. Além disso, a maioria dos estudos utilizou modelos de epilepsia com crises focais, diferente do que acontece durante o SE, no qual as crises são generalizadas. Como citado acima, apenas um animal que recebeu CBX apresentou recuperação comportamental do estado de mal epiléptico. Este animal visivelmente não exibia mais o quadro de crises generalizadas característico do SE, além de ter ocorrido extinção da atividade epileptiforme do ponto de vista eletrofisiológico. Apesar do animal não ter sobrevivido, estes resultados são positivos, uma vez que o processo de extinção do SE ocorreu antecipadamente, com repercussões comportamentais. Talvez este animal em particular apresentasse maior sensibilidade à CBX, resultando em efeitos mais expressivos sobre o SE. O uso de outras concentrações de CBX poderia gerar resultados semelhantes de modo mais homogêneo nos animais tratados.

Pelo fato de a CBX não ter efeitos específicos sobre canais de JC neuronais ou gliais, não é possível estabelecer a contribuição destes elementos celulares específicos para os efeitos observados neste estudo. Maier et al. (2002) mostraram atenuação das descargas epileptiformes provocadas por 4-AP em fatias hipocampais obtidas de camundongos *knockout* para Cx36. No entanto, não podemos excluir a possibilidade da contribuição do bloqueio glial pela CBX na redução dos potenciais epileptiformes observada em nosso modelo. De fato, já foi demonstrado que a CBX diminui a eficiência do mecanismo de tamponamento de potássio glial em fatias de neocórtex de rato (Holthoff e Witte, 2000). Apesar de não terem ocorrido alterações da expressão

proteica de Cx43 e Cx36 em nossos animais avaliados no período agudo do modelo, é possível que mesmo pequenas alterações dos canais que as expressam contribuam para o estabelecimento das crises epilépticas. Outro possível alvo da CBX são os hemicanais compostos por panexinas (outra família de proteínas que formam hemicanais), que sabidamente também são bloqueadas por esse composto (Bruzzone et al., 2005).

Foi possível constatar que os animais do grupo SE+CBX passaram a apresentar os chamados períodos flat em intervalo de tempo menor após aplicação de CBX quando comparados aos animais que receberam salina ao invés de CBX. Treiman et al. (1990) descreveram a sequência dos padrões eletrencefalográficos durante SE em humanos e em três modelos experimentais, incluindo o da pilocarpina. Estes autores descreveram cinco padrões, sendo que todos foram vistos em humanos e nos modelos experimentais, sugerindo que esta sequência de alterações do EEG representa a história natural da evolução do EEG durante SE generalizado convulsivo, quando não tratado. A sequência descrita por Treiman et al. inclui, nas duas últimas fases do SE, a ocorrência dos períodos flat (a sequência descrita dos padrões do SE compreende: crises eletrográficas discretas; descargas ictais contínuas com amplitude e frequência crescente e decrescente; descargas ictais contínuas; descargas ictais contínuas com períodos flat e descargas epileptiformes periódicas "on a flat background"), que de acordo com os autores, pode estar relacionada ao aumento de atividade inibitória em resposta ao SE prolongado. Dados deste mesmo grupo (Walton et al., 1988) apontam para aumento progressivo da concentração de GABA em várias áreas do encéfalo durante SE experimental, apesar da existência de dados controversos a respeito das concentrações de GABA durante SE (Cataltepe et al., 1996; Hasegawa et al., 2004).

De acordo com Steriade et al. (1994), a análise do chamado burst suppression (padrão eletrofisiológico que contém épocas flat) induzido em gatos por vários anestésicos, mostrou que 95% dos neurônios corticais estavam eletricamente silentes durante os períodos flat. Eles observaram que hiperpolarização dos neurônios corticais precedia estes períodos. Sabe-se que interneurônios GABAérgicos são acoplados por JC compostas pela Cx36 (Buzsácki, 2001). Já foi demonstrado que, em fatias de encéfalo de camundongos knockout para Cx36, a remoção do gene resulta em inibição cortical inicialmente mais fraca, porém mais duradoura, durante descargas de alta frequência (Postma et al., 2011). De acordo com os autores, isto indica facilitação de respostas inibitórias diante de altas frequências, sendo que estes resultados corroboram dados semelhantes encontrados in vivo (Butovas et al., 2006). Deste modo, é possível que a antecipação do surgimento dos períodos flat visto em nossos animais em SE que receberam CBX, seja decorrente da facilitação GABAérgica que ocorre após desacoplamento de interneurônios inibitórios, já que hiperpolarização foi observada antes da ocorrência destes períodos (Steriade et al., 1994).

Ao observarmos o período de estado de mal epiléptico dos animais do grupo controle SE nota-se que este é um processo que naturalmente tende a se extinguir, apresentando, com o passar do tempo, redução principalmente da voltagem dos potenciais epileptiformes. Os animais podem apresentar diferenças no que se refere à frequência e amplitude dos potenciais, e, além disto, pode haver diferenças também na evolução do estado de mal epiléptico,

com alguns animais exibindo supressão do processo epileptiforme de forma antecipada em relação a outros. No entanto, é importante salientar que mesmo havendo estas características individuais, houve nítida diferença, quando compararam-se os mesmos períodos pós-salina e pós-CBX dos grupos controle SE e experimental SE + CBX, respectivamente, em relação aos parâmetros avaliados. Sendo assim, os efeitos observados no grupo SE + CBX devem ter ocorrido de fato devido à ação da CBX, e não simplesmente devido à própria evolução natural do SE.

De acordo com os resultados apontados, pode-se sugerir que os canais de JC desempenham um papel importante na fisiopatologia da epilepsia do lobo temporal, e que estes canais podem representar um alvo terapêutico para essa patologia.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- A Cx43 sofre alterações no hipocampo de ratos durante os períodos latente e crônico do modelo de ELT induzido por pilocarpina;
- Não foram observadas alterações significativas da expressão de Cx36 no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de ELT;
- A CBX n\u00e3o provocou mudan\u00e7as no eletrocorticograma de base de ratos controle;
- O bloqueador de canais de JC CBX produziu efeitos antiepileptiformes quando aplicado sistemicamente em ratos em estado de mal epiléptico induzido por pilocarpina;
- Os canais de junções comunicantes podem estar envolvidos na manutenção da atividade epileptiforme induzida por pilocarpina em ratos.

REFERÊNCIAS*

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007]

*De acordo com:

May 22].

Amaral D, Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. The hippocampus book. New York: Oxford University Press; 2007. p. 37-114.

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

Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, Leenstra S, Yankaya B, Troost D. Expression of connexin 43 and connexin 32 gap-junction proteins in epilepsy-associated brain tumors and in the perilesional epileptic cortex. Acta Neuropathol. 2001; 101:449-59.

Avoli M. GABA-mediated synchronous potentials and seizure generation. Epilepsia. 1996; 37:1035-42.

Babb TL, Brown WJ, Pretorius J, Davenport C, Lieb JP, Crandall PH. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. Epilepsia. 1984^a; 25:729-40.

Babb TL, Lieb JP, Brown WJ, Pretorius J, Crandall PH. Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. Epilepsia. 1984^b; 25:721-8.

Barrio LC, Suchyna T, Bargiello T, Xu LX, Roginski RS, Bennett MV, Nicholson BJ. Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991; 88:8410-4.

Bartolomei F, Khalil M, Wendling F, Sontheimer A, Regis J, Ranjeva JP, Guye M, Chauvel P. Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. Epilepsia. 2005; 46:677-87.

Beaumont M, Maccaferri G. Is connexin36 critical for GABAergic hypersynchronization in the hippocampus? J Physiol. In press 2011.

Beheshti S, Sayyah M, Golkar M, Sepehri H, Babaie J, Vaziri B. Changes in hippocampal connexin 36 mRNA and protein levels during epileptogenesis in the kindling model of epilepsy. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2010; 34:510-5.

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 Res. 2000; 865:121-38.

Bennet MVLC, J. E.; Bukauskas, F. F.; Sáez, J. C. New roles for astrocytes: Gap junction hemichannels have something to communicate. Trends in Neurosciences. 2003; 26:610-7.

Bennett MV, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Saez JC. Gap junctions: new tools, new answers, new questions. Neuron. 1991; 6:305-20.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshe SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. Epilepsia. 2010; 51:676-85.

Blumcke I. Neuropathology of focal epilepsies: a critical review. Epilepsy Behav. 2009; 15:34-9.

Bordey A, Sontheimer H. Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. Epilepsy Res. 1998; 32:286-303.

Bostanci MO, Bagirici F. Anticonvulsive effects of carbenoxolone on penicillininduced epileptiform activity: an in vivo study. Neuropharmacology. 2007; 52:362-7.

Bragin A, Mody I, Wilson CL, Engel J, Jr. Local generation of fast ripples in epileptic brain. J Neurosci. 2002; 22:2012-21.

Bruzzone R, Barbe MT, Jakob NJ, Monyer H. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in Xenopus oocytes. J Neurochem. 2005; 92:1033-43.

Buckmaster PS, Dudek FE. In vivo intracellular analysis of granule cell axon reorganization in epileptic rats. J Neurophysiol. 1999; 81:712-21.

Butovas S, Hormuzdi SG, Monyer H, Schwarz C. Effects of electrically coupled inhibitory networks on local neuronal responses to intracortical microstimulation. J Neurophysiol. 2006; 96:1227-36.

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

Caltabiano R, Torrisi A, Condorelli D, Albanese V, Lanzafame S. High levels of connexin 43 mRNA in high grade astrocytomas. Study of 32 cases with in situ hybridization. Acta Histochem. 2010; 112:529-35.

Canteras N, Bittencourt J. Comportamentos motivados e emoções. In: Lent R, editors. Neurociência da mente e do comportamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 228-40.

Carlen PL, Skinner F, Zhang L, Naus C, Kushnir M, Perez Velazquez JL. The role of gap junctions in seizures. Brain Res Brain Res Rev. 2000; 32:235-41.

Cataltepe O, Towfighi J, Vannucci RC. Cerebrospinal fluid concentrations of glutamate and GABA during perinatal cerebral hypoxia-ischemia and seizures. Brain Res. 1996; 709:326-30.

Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. Neuron. 1991; 6:983-92.

Chew SS, Johnson CS, Green CR, Danesh-Meyer HV. Role of connexin43 in central nervous system injury. Exp Neurol. 2010; 225:250-61.

Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. Neuroscience. 1987; 23:953-68.

Collignon F, Wetjen NM, Cohen-Gadol AA, Cascino GD, Parisi J, Meyer FB, Marsh WR, Roche P, Weigand SD. Altered expression of connexin subtypes in mesial temporal lobe epilepsy in humans. J Neurosurg. 2006; 105:77-87.

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

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

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. Eur J Neurosci. 2003; 18:1807-27.

Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. Science. 1990; 247:470-3.

Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95:15735-40.

D'Hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Vinken M, De Vuyst E, De Bock M, Wang N, Rogiers V, Leybaert L, Himpens B, Bultynck G. Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. Cell Signal. 2011; 23:305-16.

Davidson JS, Baumgarten IM. Glycyrrhetinic acid derivatives: a novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication. Structure-activity relationships. J Pharmacol Exp Ther. 1988; 246:1104-7.

Davidson JS, Baumgarten IM, Harley EH. Reversible inhibition of intercellular junctional communication by glycyrrhetinic acid. Biochem Biophys Res Commun. 1986; 134:29-36.

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.

Decrock E, Vinken M, De Vuyst E, Krysko DV, D'Herde K, Vanhaecke T, Vandenabeele P, Rogiers V, Leybaert L. Connexin-related signaling in cell death: to live or let die? Cell Death Differ. 2009: 16:524-36.

Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? Nat Rev Neurosci. 2010; 11:339-50.

Dermietzel R. Molecular diversity and plasticity of gap junctions in the nervous system. In: Spray D, Dermietzel R, editors. Gap junctions in the nervous system. New York: Springer; 1996. 317 p.

Dermietzel R. Gap junction wiring: a 'new' principle in cell-to-cell communication in the nervous system? Brain Res Brain Res Rev. 1998; 26:176-83.

Dermietzel R, Spray DC. Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? Trends Neurosci. 1993; 16:186-92.

Ding S, Fellin T, Zhu Y, Lee SY, Auberson YP, Meaney DF, Coulter DA, Carmignoto G, Haydon PG. Enhanced astrocytic Ca2+ signals contribute to neuronal excitotoxicity after status epilepticus. J Neurosci. 2007; 27:10674-84.

Dobbins KR, Saul RF. Transient visual loss after licorice ingestion. J Neuroophthalmol. 2000; 20:38-41.

Duncan JS, Schofield G, Duncan EK. Pedometer-determined physical activity and body composition in New Zealand children. Med Sci Sports Exerc. 2006; 38:1402-9.

Duvernoy H. The human hippocampus. New York: Springer; 2005. 240 p.

Engel J, Jr., Burchfiel J, Ebersole J, Gates J, Gotman J, Homan R, Ives J, King D, Lieb J, Sato S, et al. Long-term monitoring for epilepsy. Report of an IFCN committee. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1993; 87:437-58.

Engel J, Shields W. Surgically remediable syndromes. In: Engel J, Pedley T, editors. Epilepsy: A comprehensive textbook. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 1687-96.

Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. Biochem J. 2006; 397:1-14.

Finkbeiner S. Calcium waves in astrocytes-filling in the gaps. Neuron. 1992; 8:1101-8.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J, Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Epilepsia. 2005; 46:470-2.

Fonseca CG, Green CR, Nicholson LF. Upregulation in astrocytic connexin 43 gap junction levels may exacerbate generalized seizures in mesial temporal lobe epilepsy. Brain Res. 2002; 929:105-16.

French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. Ann Neurol. 1993; 34:774-80.

Gabriel S, Eilers A, Kivi A, Kovacs R, Schulze K, Lehmann TN, Heinemann U. Effects of barium on stimulus induced changes in extracellular potassium concentration in area CA1 of hippocampal slices from normal and pilocarpine-treated epileptic rats. Neurosci Lett. 1998^a; 242:9-12.

Gabriel S, Kivi A, Kovacs R, Lehmann TN, Lanksch WR, Meencke HJ, Heinemann U. Effects of barium on stimulus-induced changes in [K+]o and field potentials in dentate gyrus and area CA1 of human epileptic hippocampus. Neurosci Lett. 1998^b; 249:91-4.

Gajda Z, Gyengesi E, Hermesz E, Ali KS, Szente M. Involvement of gap junctions in the manifestation and control of the duration of seizures in rats in vivo. Epilepsia. 2003; 44:1596-600.

Gallagher CJ, Salter MW. Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors. J Neurosci. 2003; 23:6728-39.

Gareri P, Condorelli D, Belluardo N, Citraro R, Barresi V, Trovato-Salinaro A, Mudo G, Ibbadu GF, Russo E, De Sarro G. Antiabsence effects of carbenoxolone in two genetic animal models of absence epilepsy (WAG/Rij rats and Ih/Ih mice). Neuropharmacology. 2005; 49:551-63.

Gareri P, Condorelli D, Belluardo N, Russo E, Loiacono A, Barresi V, Trovato-Salinaro A, Mirone MB, Ferreri Ibbadu G, De Sarro G. Anticonvulsant effects of carbenoxolone in genetically epilepsy prone rats (GEPRs). Neuropharmacology. 2004; 47:1205-16.

Getting PA. Modification of neuron properties by electrotonic synapses. I. Input resistance, time constant, and integration. J Neurophysiol. 1974; 37:846-57.

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

Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. Nat Rev Neurosci. 2010; 11:87-99.

Gibson JR, Beierlein M, Connors BW. Functional properties of electrical synapses between inhibitory interneurons of neocortical layer 4. J Neurophysiol. 2005; 93:467-80.

Gigout S, Louvel J, Kawasaki H, D'Antuono M, Armand V, Kurcewicz I, Olivier A, Laschet J, Turak B, Devaux B, Pumain R, Avoli M. Effects of gap junction blockers on human neocortical synchronization. Neurobiol Dis. 2006^a; 22:496-508.

Gigout S, Louvel J, Pumain R. Effects in vitro and in vivo of a gap junction blocker on epileptiform activities in a genetic model of absence epilepsy. Epilepsy Res. 2006^b; 69:15-29.

Gladwell SJ, Jefferys JG. Second messenger modulation of electrotonic coupling between region CA3 pyramidal cell axons in the rat hippocampus. Neurosci Lett. 2001; 300:1-4.

Godwin AJ, Green LM, Walsh MP, McDonald JR, Walsh DA, Fletcher WH. In situ regulation of cell-cell communication by the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. Mol Cell Biochem. 1993; 127-128:293-307.

Gonzalez-Nieto D, Gomez-Hernandez JM, Larrosa B, Gutierrez C, Munoz MD, Fasciani I, O'Brien J, Zappala A, Cicirata F, Barrio LC. Regulation of neuronal connexin-36 channels by pH. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105:17169-74.

Guan X, Wilson S, Schlender KK, Ruch RJ. Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18 beta-glycyrrhetinic acid. Mol Carcinog. 1996; 16:157-64.

Guedes FAG-A, O.Y.; Leite, J.P. Plasticidade neuronal associada à epilepsia do lobo temporal mesial: insights a partir de estudos em humanos e em modelos animais. J. Epilepsy Clin. Neurophys. 2006; 12:10-7.

Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. J Neurosci. 1999; 19:520-8.

Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL, Nathanson NM. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94:13311-6.

Hasegawa D, Matsuki N, Fujita M, Ono K, Orima H. Kinetics of glutamate and gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid in a canine model of complex partial status epilepticus induced by kainic acid. J Vet Med Sci. 2004; 66:1555-9.

Hassinger TD, Guthrie PB, Atkinson PB, Bennett MV, Kater SB. An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93:13268-73.

Hinterkeuser S, Schroder W, Hager G, Seifert G, Blumcke I, Elger CE, Schramm J, Steinhauser C. Astrocytes in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy display changes in potassium conductances. Eur J Neurosci. 2000; 12:2087-96.

Holthoff K, Witte OW. Directed spatial potassium redistribution in rat neocortex. Glia. 2000; 29:288-92.

Houser CR. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. Brain Res. 1990; 535:195-204.

Iglesias R, Dahl G, Qiu F, Spray DC, Scemes E. Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte "hemichannels". J Neurosci. 2009; 29:7092-7.

Jacobson GM, Voss LJ, Melin SM, Mason JP, Cursons RT, Steyn-Ross DA, Steyn-Ross ML, Sleigh JW. Connexin36 knockout mice display increased sensitivity to pentylenetetrazol-induced seizure-like behaviors. Brain Res. 2010; 1360:198-204.

Jahromi SS, Wentlandt K, Piran S, Carlen PL. Anticonvulsant actions of gap junctional blockers in an in vitro seizure model. J Neurophysiol. 2002; 88:1893-902.

Janigro D, Gasparini S, D'Ambrosio R, McKhann G, 2nd, DiFrancesco D. Reduction of K+ uptake in glia prevents long-term depression maintenance and causes epileptiform activity. J Neurosci. 1997; 17:2813-24.

Jellinck PH, Monder C, McEwen BS, Sakai RR. Differential inhibition of 11 betahydroxysteroid dehydrogenase by carbenoxolone in rat brain regions and peripheral tissues. J Steroid Biochem Mol Biol. 1993; 46:209-13.

Kandel E, Kupfermann I, Iversen S. Aprendizagem e memória. In: Kandel E, Schwartz J, Jessel T, editors. Princípios da neurociência. Barueri: Manole; 2003. p. 1227-46.

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. Int J Dev Neurosci. 2010; 28:39-52.

Kofuji P, Newman EA. Potassium buffering in the central nervous system. Neuroscience. 2004; 129:1045-56.

Kohling R, Gladwell SJ, Bracci E, Vreugdenhil M, Jefferys JG. Prolonged epileptiform bursting induced by 0-Mg(2+) in rat hippocampal slices depends on gap junctional coupling. Neuroscience. 2001; 105:579-87.

Konnerth A, Heinemann U, Yaari Y. Nonsynaptic epileptogenesis in the mammalian hippocampus in vitro. I. Development of seizurelike activity in low extracellular calcium. J Neurophysiol. 1986; 56:409-23.

Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. Biochem J. 2006; 394:527-43.

Lan WR, Hou CJ, Yen CH, Shih BF, Wang AM, Lee TY, Tsai CH, Yeh HI. Effects of carbenoxolone on flow-mediated vasodilatation in healthy adults. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011; 301:H1166-H72.

Lee SH, Magge S, Spencer DD, Sontheimer H, Cornell-Bell AH. Human epileptic astrocytes exhibit increased gap junction coupling. Glia. 1995; 15:195-202.

Lehmkuhle MJ, Thomson KE, Scheerlinck P, Pouliot W, Greger B, Dudek FE. A simple quantitative method for analyzing electrographic status epilepticus in rats. J Neurophysiol. 2009; 101:1660-70.

Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. Neurosci Biobehav Rev. 1990; 14:511-7.

Longo BM, Mello LE. Blockade of pilocarpine- or kainate-induced mossy fiber sprouting by cycloheximide does not prevent subsequent epileptogenesis in rats. Neurosci Lett. 1997; 226:163-6.

Longo BM, Mello LE. Supragranular mossy fiber sprouting is not necessary for spontaneous seizures in the intrahippocampal kainate model of epilepsy in the rat. Epilepsy Res. 1998; 32:172-82.

Lynch M, Sutula T. Recurrent excitatory connectivity in the dentate gyrus of kindled and kainic acid-treated rats. J Neurophysiol. 2000; 83:693-704.

Maier N, Guldenagel M, Sohl G, Siegmund H, Willecke K, Draguhn A. Reduction of high-frequency network oscillations (ripples) and pathological network discharges in hippocampal slices from connexin 36-deficient mice. J Physiol. 2002; 541:521-8.

Margineanu DG, Klitgaard H. Can gap-junction blockade preferentially inhibit neuronal hypersynchrony vs. excitability? Neuropharmacology. 2001; 41:377-83.

Mas C, Taske N, Deutsch S, Guipponi M, Thomas P, Covanis A, Friis M, Kjeldsen MJ, Pizzolato GP, Villemure JG, Buresi C, Rees M, Malafosse A, McCracken CB, Roberts DC. A single evoked afterdischarge produces rapid

time-dependent changes in connexin36 protein expression in adult rat dorsal hippocampus. Neurosci Lett. 2006; 405:84-8.

Medina-Ceja L, Cordero-Romero A, Morales-Villagran A. Antiepileptic effect of carbenoxolone on seizures induced by 4-aminopyridine: a study in the rat hippocampus and entorhinal cortex. Brain Res. 2008; 1187:74-81.

Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. Epilepsia. 1993; 34:985-95.

Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. Neuron. 2011; 70:687-702.

Nagy JI, Rash JE. Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. Brain Res Brain Res Rev. 2000; 32:29-44.

Naus CC, Bechberger JF, Paul DL. Gap junction gene expression in human seizure disorder. Exp Neurol. 1991; 111:198-203.

Nedergaard M. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. Science. 1994; 263:1768-71.

Noronha AL, Borges MA, Marques LH, Zanetta DM, Fernandes PT, de Boer H, Espindola J, Miranda CT, Prilipko L, Bell GS, Sander JW, Li LM. Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. Epilepsia. 2007; 48:880-5.

Oelze I, Kartenbeck J, Crusius K, Alonso A. Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. J Virol. 1995; 69:4489-94.

Osten PW, W.; Sprengel, R. Molecular mechanisms of synaptic function in the hippocampus: neurotransmitter exocytosis and glutamatergic, GABAergic, and cholinergic transmission. In: Andersen PM, R.; Amaral, D.; Bliss, T.; O'Keefe, J., editors. The hippocampus book. New York: Oxford University Press; 2007. p. 243-95.

Pais I, Hormuzdi SG, Monyer H, Traub RD, Wood IC, Buhl EH, Whittington MA, LeBeau FE. Sharp wave-like activity in the hippocampus in vitro in mice lacking the gap junction protein connexin 36. J Neurophysiol. 2003; 89:2046-54.

Parenti R, Campisi A, Vanella A, Cicirata F. Immunocytochemical and RT-PCR analysis of connexin36 in cultures of mammalian glial cells. Arch Ital Biol. 2002; 140:101-8.

Pascual-Leone A, Valls-Sole J, Brasil-Neto JP, Cohen LG, Hallett M. Seizure induction and transcranial magnetic stimulation. Lancet. 1992; 339:997. Pedley T. Neurobiologia da epilepsia de lobo temporal. In: Gurerreiro C, Guerreiro M, editors. Epilepsia. São Paulo: Lemos; 1996. p. 19-30.

Perez-Velazquez JL, Valiante TA, Carlen PL. Modulation of gap junctional mechanisms during calcium-free induced field burst activity: a possible role for electrotonic coupling in epileptogenesis. J Neurosci. 1994; 14:4308-17.

Perez Velazquez JL, Carlen PL. Gap junctions, synchrony and seizures. Trends Neurosci. 2000; 23:68-74.

Perez Velazquez JL, Frantseva MV, Naus CC. Gap junctions and neuronal injury: protectants or executioners? Neuroscientist. 2003; 9:5-9.

Perreault P, Avoli M. 4-aminopyridine-induced epileptiform activity and a GABA-mediated long-lasting depolarization in the rat hippocampus. J Neurosci. 1992; 12:104-15.

Postma F, Liu CH, Dietsche C, Khan M, Lee HK, Paul D, Kanold PO. Electrical synapses formed by connexin36 regulate inhibition- and experience-dependent plasticity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108:13770-5.

Priel MR, Albuquerque EX. Short-term effects of pilocarpine on rat hippocampal neurons in culture. Epilepsia. 2002; 43 Suppl 5:40-6.

Ross FM, Gwyn P, Spanswick D, Davies SN. Carbenoxolone depresses spontaneous epileptiform activity in the CA1 region of rat hippocampal slices. Neuroscience. 2000; 100:789-96.

Rozental R, Giaume C, Spray DC. Gap junctions in the nervous system. Brain Res Brain Res Rev. 2000; 32:11-5.

Samoilova M, Wentlandt K, Adamchik Y, Velumian AA, Carlen PL. Connexin 43 mimetic peptides inhibit spontaneous epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures. Exp Neurol. 2008; 210:762-75.

Schweitzer JS, Patrylo PR, Dudek FE. Prolonged field bursts in the dentate gyrus: dependence on low calcium, high potassium, and nonsynaptic mechanisms. J Neurophysiol. 1992; 68:2016-25.

Scorza C. Expressão da proteína nestina no cérebro de ratos submetidos ao status epilepticus induzido pela pilocarpina: avaliação do período pós-natal ao envelhecimento. [tese]. São Paulo: Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Universidade Federal de São Paulo; 2006.

Sloviter RS. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. C R Biol. 2005; 328:143-53.

Smolders I, Khan GM, Manil J, Ebinger G, Michotte Y. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. Br J Pharmacol. 1997; 121:1171-9.

Sohl G, Guldenagel M, Beck H, Teubner B, Traub O, Gutierrez R, Heinemann U, Willecke K. Expression of connexin genes in hippocampus of kainate-treated and kindled rats under conditions of experimental epilepsy. Brain Res Mol Brain Res. 2000; 83:44-51.

Sohl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions. Nat Rev Neurosci. 2005; 6:191-200.

Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. Cardiovasc Res. 2004; 62:228-32.

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

Stark C. Functional role of the human hippocampus. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. The hippocampus book. New York: Oxford University Press; 2007. p. 549-79.

Steinhauser C, Seifert G. Glial membrane channels and receptors in epilepsy: impact for generation and spread of seizure activity. Eur J Pharmacol. 2002; 447:227-37.

Steriade M, Amzica F, Contreras D. Cortical and thalamic cellular correlates of electroencephalographic burst-suppression. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1994; 90:1-16.

Steriade M, Contreras D. Spike-wave complexes and fast components of cortically generated seizures. I. Role of neocortex and thalamus. J Neurophysiol. 1998; 80:1439-55.

Sutula T, He XX, Cavazos J, Scott G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. Science. 1988; 239:1147-50.

Szente M, Gajda Z, Said Ali K, Hermesz E. Involvement of electrical coupling in the in vivo ictal epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the neocortex. Neuroscience. 2002; 115:1067-78.

Tauck DL, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. J Neurosci. 1985; 5:1016-22.

Theis M, Sohl G, Speidel D, Kuhn R, Willecke K. Connexin43 is not expressed in principal cells of mouse cortex and hippocampus. Eur J Neurosci. 2003; 18:267-74.

Thom M, Zhou J, Martinian L, Sisodiya S. Quantitative post-mortem study of the hippocampus in chronic epilepsy: seizures do not inevitably cause neuronal loss. Brain. 2005; 128:1344-57.

Timo-laria C, Negrao N, Schmidek WR, Hoshino K, Lobato de Menezes CE, Leme da Rocha T. Phases and states of sleep in the rat. Physiol Behav. 1970; 5:1057-62.

Traub R, Whittington M. Epilepsy. In: Traub R, Whittington M, editors. Cortical oscillations in health and disease. New York: Oxford University Press; 2010. p. 70-104.

Traub RD. Fast Oscillations and Epilepsy. Epilepsy Curr. 2003; 3:77-9.

Traub RD, Bibbig R, Piechotta A, Draguhn R, Schmitz D. Synaptic and nonsynaptic contributions to giant ipsps and ectopic spikes induced by 4-aminopyridine in the hippocampus in vitro. J Neurophysiol. 2001^a; 85:1246-56.

Traub RD, Whittington MA, Buhl EH, LeBeau FE, Bibbig A, Boyd S, Cross H, Baldeweg T. A possible role for gap junctions in generation of very fast EEG oscillations preceding the onset of, and perhaps initiating, seizures. Epilepsia. 2001^b; 42:153-70.

Treiman DM, Walton NY, Kendrick C. A progressive sequence of electroencephalographic changes during generalized convulsive status epilepticus. Epilepsy Res. 1990; 5:49-60.

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. Behav Brain Res. 1983; 9:315-35.

Uusisaari M, Smirnov S, Voipio J, Kaila K. Spontaneous epileptiform activity mediated by GABA(A) receptors and gap junctions in the rat hippocampal slice following long-term exposure to GABA(B) antagonists. Neuropharmacology. 2002; 43:563-72.

Val da Silva RA B-S, GL, Zanetti AC, Romcy-Pereira, RN, Velasco TR, Leita JP. Papel das sinapses elétricas em crises epilépticas. J Epilepsy Clin Neurophysiol. 2010; 16:149-54.

Valiante TA, Perez Velazquez JL, Jahromi SS, Carlen PL. Coupling potentials in CA1 neurons during calcium-free-induced field burst activity. J Neurosci. 1995; 15:6946-56.

Valle AC, Timo-Iaria C, Fraga JL, Sameshima K, Yamashita R. Theta waves and behavioral manifestations of alertness and dreaming activity in the rat. Braz J Med Biol Res. 1992; 25:745-9.

Vernadakis A. Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. Prog Neurobiol. 1996; 49:185-214.

Walker M, Chan D, Thom M. Hippocampus and human disease. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. The hippocampus book. New York: Oxford University Press; 2007. p. 769-812.

Walton NY, Treiman DM. Experimental secondarily generalized convulsive status epilepticus induced by D,L-homocysteine thiolactone. Epilepsy Res. 1988; 2:79-86.

Xiong ZQ, Stringer JL. Astrocytic regulation of the recovery of extracellular potassium after seizures in vivo. Eur J Neurosci. 1999; 11:1677-84.

Xu L, Zeng LH, Wong M. Impaired astrocytic gap junction coupling and potassium buffering in a mouse model of tuberous sclerosis complex. Neurobiol Dis. 2009; 34:291-9.

Yamawaki N, Stanford IM, Hall SD, Woodhall GL. Pharmacologically induced and stimulus evoked rhythmic neuronal oscillatory activity in the primary motor cortex in vitro. Neuroscience. 2008; 151:386-95.

Yang L, Ling DS. Carbenoxolone modifies spontaneous inhibitory and excitatory synaptic transmission in rat somatosensory cortex. Neurosci Lett. 2007; 416:221-6.

Yang Q, Michelson HB. Gap junctions synchronize the firing of inhibitory interneurons in guinea pig hippocampus. Brain Res. 2001; 907:139-43.

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

Yoon JJ, Green CR, O'Carroll SJ, Nicholson LF. Dose-dependent protective effect of connexin43 mimetic peptide against neurodegeneration in an ex vivo model of epileptiform lesion. Epilepsy Res. 2010; 92:153-62.

Zhang W, Yamawaki R, Wen X, Uhl J, Diaz J, Prince DA, Buckmaster PS. Surviving hilar somatostatin interneurons enlarge, sprout axons, and form new synapses with granule cells in a mouse model of temporal lobe epilepsy. J Neurosci. 2009; 29:14247-56.