### **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

#### 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 е 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,

17

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<sup>a</sup>; 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<sup>b</sup>; 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 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 como um agonista colinérgico muscarínico. Quando aplicada age sistemicamente em altas doses (300-380 mg/kg), gera um guadro 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 guadro 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 nãodeclarativa / 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 fímbrio-denteado; 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 trisináptica" (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, 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 Ca<sup>2+</sup>, alterações de Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup>, 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 astrócitooligodendrócito (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.

## **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 não provocou mudanças 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\***

\*De acordo com :

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <u>http://www.icmje.org</u> [2007 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<sup>a</sup>; 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<sup>b</sup>; 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<sup>a</sup>; 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<sup>b</sup>; 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<sup>a</sup>; 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<sup>b</sup>; 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 GABAmediated 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 receptormediated 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-Iaria 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<sup>a</sup>; 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<sup>b</sup>; 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.