

Papel das Sinapses Elétricas em Crises Epilépticas

Raquel Araujo Do Val-da Silva, Graziela Lima Bachiega-Salviano, Ana Claudia Zanetti, Rodrigo Neves Romcy-Pereira, Tonicarlo Rodrigues Velasco, João Pereira Leite

Depto. Neurociências e Ciências do Comportamento, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, SP, Brasil

RESUMO

Introdução: No sistema nervoso central a comunicação entre neurônios se realiza através de estruturas denominadas sinapses: elétricas ou químicas. As sinapses elétricas são formadas pela aproximação das membranas plasmáticas de dois neurônios formando estruturas chamadas junções comunicantes (*gap junctions*, do inglês). As junções comunicantes são compostas por seis subunidades da proteína conexina de cada membrana, formando poros que comunicam o citoplasma de células adjacentes e permitem a passagem de íons e pequenas moléculas. **Objetivos:** A presente revisão pretende descrever e discutir os principais resultados que apontam para uma importante relação entre junções comunicantes e sincronia neuronal durante crises epilépticas. **Resultados e Conclusão:** Quando um neurônio é despolarizado, este tipo de comunicação permite a rápida transferência iônica entre as células, promovendo alta sincronia neuronal. Recentemente, o papel das junções comunicantes na geração e propagação de descargas epilépticas tem sido estudado através do uso de diferentes modelos experimentais *in vivo*, *in vitro* e *in silico* (modelos computacionais).

Unitermos: Junções comunicantes, sinapse elétrica, conexinas, crises epilépticas.

ABSTRACT

The role of electrical synapses in epileptic seizures

Introduction: In the central nervous system, neuronal communication is accomplished by structures called synapses: electrical or chemical. Electrical synapses are formed by the apposition of plasmatic membranes at gap junctions and the interaction of connexin subunits from two neurons. At this site, connexin complexes create intercellular pores that communicate the cytoplasm of adjacent neurons and allow free flow of ions and small molecules. **Objective:** In this review, we will present and discuss recent results showing the possible involvement of electrical synapses in the neuronal hypersynchronization during epileptic seizures. **Results and conclusion:** When a neuron is depolarized, ions flow very rapidly from one cell to the other promoting high neuronal synchrony. More recently, the role of gap junctions in the generation and propagation of epileptic discharges has been investigated using combined approaches of *in vivo*, *in vitro* and *in silico* (computational) models.

Keyword: Gap junctions, electrical synapses, connexin and epileptic seizures

INTRODUÇÃO

As investigações sobre junções comunicantes (JC) no sistema nervoso têm uma longa história, iniciando com um primeiro estudo reportando a comunicação direta e acoplamento elétrico entre células nervosas de invertebrados.¹¹ Este trabalho pioneiro abriu caminho para muitos outros que estabeleceram a comunicação elétrica entre

neurônios, a chamada de sinapse elétrica, como distinta da neurotransmissão química.⁴ Subsequentemente, vários estudos demonstraram que as sinapses elétricas não estavam restritas a invertebrados, mas também podiam ser encontradas em vertebrados, incluindo os mamíferos.³

Hoje sabemos que há dois tipos de sinapses no sistema nervoso central (SNC): as sinapses elétricas e as sinapses químicas. O estudo de microscopia eletrônica das sinapses elétricas mostrou que elas são formadas pela aposição das membranas plasmáticas de dois neurônios resultando numa

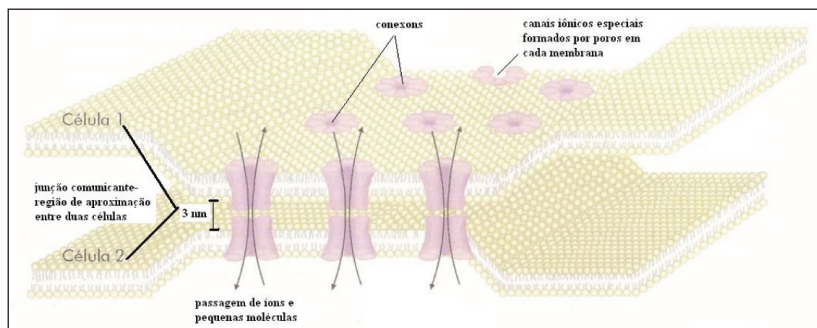


Figura 1. Junções comunicantes: Canais formados pelas conexinas, unindo o citoplasma de duas células permitindo a passagem de íons e pequenas moléculas em ambas as direções (Adaptada de Lent, 2001).¹⁹

estrutura de adesão intercelular com separação de apenas ~3 nm. Este tipo de junção possui complexos protéicos que formam canais iônicos através de suas membranas, os *conexons* (Figura 1). Cada *conexon* é composto pela interação de duas proteínas *conexinas*, cada uma proveniente de um neurônio. Cada *conexina*, por sua vez, é formada por seis subunidades com inúmeras isoformas e pode se apresentar em dois estados: aberto ou fechado.

Assim, quando abertos, os *conexons* formam verdadeiros poros permeáveis a íons e pequenas moléculas. Durante esta comunicação não há intermediários químicos, fazendo que ela seja ultrarrápida com duração de apenas centésimos de milissegundo.¹⁹ Isto permite que uma população neuronal dispare em alta sincronia.^{7,22}

O conhecimento sobre o papel das JC no SNC se expandiu devido ao uso combinado de técnicas de biologia molecular no estudo de células nervosas e gliais em cultura resultando na identificação de seus constituintes moleculares, as *conexinas*.^{2,6} Estudos através de microscopia eletrônica, imunohistoquímica, eletrofisiologia, injeção intracelular de traçadores e biologia molecular mostraram a presença de JC e expressão de *conexinas* em diversas regiões do SNC. Estas regiões incluem o hipotálamo, estriado, oliva inferior, hipocampo, bulbo olfatório, retina, córtex e cerebelo.²⁶

Segundo Rouach e cols., foram detectados 8 diferentes tipos de *conexinas* em neurônios no SNC.²⁵ A análise por RT-PCR do conteúdo de células individuais permitiu a detecção de RNAm que codificam diferentes isoformas de *conexinas*, como *conexina-26*, *conexina-32*, *conexina-36* e *conexina-43* em subpopulações de células corticais e hipocampais.²⁹ A *conexina-43* é mais expressa na glia, mas também está presente em neurônios da região CA1 do hipocampo.¹⁸ A expressão da *conexina-36* é restrita aos neurônios, enquanto a *conexina-32* e a *conexina-43* são encontradas em oligodendrócitos e astrócitos, respectivamente.^{18,24}

Recentemente, o papel das JC na geração de crise tem sido estudado com mais detalhes em modelos de epilepsia *in vivo*, *in vitro*, em simulações computacionais e em humanos. Estudos eletrofisiológicos têm implicado as JC na geração de oscilações muito rápidas (OMR) precedendo

as crises. Oscilações de alta frequência (> 100Hz) refletem uma sincronização de tempo curto da atividade elétrica neuronal. Tem sido demonstrado em cérebros epiléticos, que oscilações de alta frequência ocorrem em estágios precoces da epileptogênese e podem engatilhar a formação das redes neuronais geradoras de crises.⁵ Segundo Traub e cols. (2001), oscilações muito rápidas (OMR; >70Hz) do EEG são importantes e muitas vezes podem ter um papel causal no início das crises.²⁸ Todos estes dados apontam para uma relação importante entre JC, OMR e crises epiléticas, onde a ativação neuronal via JC poderia gerar as OMR que precedem e/ou iniciam crises epiléticas.

SINCRONIA, CRISES E JUNÇÕES COMUNICANTES

Alguns estudos indicam que as JC têm participação em crises epiléticas em seres humanos e animais.

Estudo em humanos

Estudo recente testou clinicamente a origem de OMR (>70Hz), que muitas vezes precedem o início das crises focais, concentrando-se no papel das JC e suas implicações clínicas.²⁸ Neste modelo foi utilizado registro de EEG subdural em crianças com displasia cortical focal com crises intratáveis. OMR foram encontradas nas crianças antes do início das crises, mas também sobrepostas a *salvas de disparos ictais* e *interictais*. Esses eventos não haviam sido registrados anteriormente, pois técnicas clássicas de registro de EEG não eram capazes de registrar sinais de alta frequência.

A partir do momento em que foi constatada a presença de OMR no início de crises em pacientes epiléticos, vários autores começaram a investigar a relação existente entre JC e crises epiléticas. Uma questão que surge é se as sinapses elétricas poderiam ser responsáveis pela indução, manutenção, e/ou controle da duração da crise, através da comunicação rápida entre neurônios neste tipo de sinapse.

Modelos animais *in vivo*

Utilizando modelos animais, Bragin e cols. (2002) estudaram a extensão da área de geração de oscilações de frequência de 250 a 600 Hz, (*fast ripples*-oscilações rápidas-

OMR) em crises espontâneas de ratos tratados com o agonista glutamatérgico, ácido caínico (AC), aplicado por injeção intrahipocampal. Foi observado que existe uma área de geração espontânea e evocação de OMR no circuito córtex entorrinal-hipocampo do rato epilético. A área de geração de OMR parece ter grupos de neurônios altamente interconectados que possuem uma retro-alimentação inibitória de interneurônios, gerando *salvas de disparos* epileptiformes, levando às crises.⁵

O envolvimento das JC na manifestação e controle da duração das crises foi testado em modelo animal utilizando o bloqueador de canal de potássio, 4-amino-piridina (4-AP) em ratos. Neste estudo, os animais receberam 4-AP para iniciar as crises e carbenoxolona (CBX; bloqueador não específico de JC) ou trimetil-amônio (TMA, promove abertura de JC) 60min depois. Foi observado que a CBX reduziu a duração e a amplitude das descargas eletroencefalográficas. O TMA teve efeito contrário. Estes dados sugerem que o envolvimento das JC pode ser crucial na sustentação da sincronização neuronal no foco epilético principal (FP), já que sua abertura ou bloqueio alterou significativamente a duração das crises.¹²

Em estudo recente, o mesmo modelo foi utilizado para investigar o significado funcional das JC na susceptibilidade, indução e manutenção das crises no cérebro de ratos em desenvolvimento com idade de 9 a 28 dias pós-natal (P9-28). Além disso, a possível contribuição das JC na indução da crise no cérebro normal foi investigada através da administração de CBX ou TMA, 5 min ou 10 min antes da aplicação de 4-AP, respectivamente. Foi observado que em animais mais jovens a abertura das JC induziu atividade eletrográfica rítmica e síncrona no córtex. Com a maturação cerebral, as crises tornaram-se focalizadas e periódicas, com amplitudes e frequência mais altas. As descobertas deste estudo sugerem que as JC não estão apenas envolvidas na gênese rítmica e na sincronização da atividade cortical, mas também podem ser responsáveis pela elevada epileptogenicidade do cérebro em desenvolvimento.¹³

Szente e cols. (2002) investigaram o papel das JC na indução e manifestação de crises induzidas por 4-AP no neocórtex de ratos. Foram avaliados registros eletroencefalográficos anteriores e posteriores às crises e também após o uso de CBX. Os registros intracelulares obtidos no local da aplicação de 4-AP revelaram atividades *ictais* com diferentes tipos de potenciais, os quais poderiam representar comunicação elétrica via JC. Quando a transmissão sináptica elétrica foi bloqueada com CBX, houve uma diminuição significativa da atividade *ictal* no foco epilético. Com estes resultados, os autores concluem que a comunicação elétrica via JC colabora para a sincronia neuronal durante a atividade epileptiforme do neocórtex de ratos.²⁷

Os efeitos do bloqueio das JC nas atividades epileptiformes no modelo genético de epilepsia de ausência

foram estudados por Gigout, Louvel e Pumain (2006). Através de registros de eletrocorticografia do córtex frontoparietal foi investigado o possível efeito antiepilético da CBX. Os dados demonstraram que a CBX reduziu a atividade locomotora por 90 min e que a intensidade das descargas ponta-onda diminuíram significativamente durante os primeiros 30 min após a CBX, o que sugere sua ação antiepilética e o envolvimento das JC nas crises.¹⁴

Modelos *in vitro*

Atualmente diversos grupos estudam a relação entre JC e crises epiléticas não apenas em modelos animais *in vivo*, mas também através de combinações de técnicas em cultura de células nervosas e gliais, o que expandiu o interesse nas JC no SNC e possibilitou o avanço de estudos nesta área.

O papel das JC na sincronização talamocortical foi investigado através da aplicação de 4-AP sobre fatias de cérebro de ratos com epilepsia de ausência da cepa GAERS (GAERS: *Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg*) e ratos não epiléticos (NER). Para testar o efeito da CBX na excitabilidade neuronal foram aplicados estímulos elétricos a cada 5 s. Nos registros, a atividade *ictal* pôde ser observada no córtex somatosensorial, insular e no hipocampo em ambas as cepas de ratos. Após aplicação CBX sobre as fatias, a frequência e duração cumulativa da atividade *ictal* diminuiu mais rapidamente nas fatias de GAERS do que nas fatias de NER. Estes resultados sugerem que os bloqueadores de JC limitam a propagação da atividade sincronizada *in vitro*.¹⁴

Kohling e cols., 2001 observaram, em modelo de fatia hipocampal de ratos, que drogas que bloqueiam as JC como o halotano, CBX e octano são capazes de converter descargas secundárias geradas a partir de eliminação completa de Mg^{+2} do banho (Mg^{+2} -zero). Contrariamente, a alcalinização celular através de TMA gerou descargas secundárias em condições em que apenas *salvas de disparos* primários ocorreram. Estes dados apontam para papel chave das JC na manutenção da atividade epilética.¹⁷

No modelo Ca^{+2} -zero de sincronia neural com bloqueio das sinapses químicas foram encontradas evidências de efeitos pró-convulsivos das JC.⁸ Os resultados mostram que manipulações que diminuem a condutância das JC, incluindo aplicação de halotano, octanol e redução do pH intracelular, também reduzem a atividade epilética induzida pelo Ca^{+2} -zero.^{8,21} De forma oposta, as descargas epiléticas foram potencializadas pelo aumento do pH intracelular, com o uso de bicarbonato, TMA^{8,21,22} e cloreto de amônia.²¹

Perez-Velazquez e cols.(1994) estudaram, em fatias hipocampais de ratos, se haveria mudanças no acoplamento neuronal via JC durante *salvas de disparos* no modelo Ca^{+2} -zero através de técnicas eletrofisiológicas e de colora-

ção das JC. Em condições controles, em que as fatias estavam imersas em fluido cerebro-espinhal artificial, 15,1% das células piramidais se mostraram acopladas. Entretanto, no grupo Ca^{+2} -zero esta taxa subiu para 34,2%. Esse aumento indica que há processos que aumentam o acoplamento eletrotônico como resultado direto da ausência de Ca^{+2} ou secundário às crises induzidas pela sua ausência.²¹ Quando a condutância das JC foi alterada pela acidificação ou alcalinização do banho, promovendo o bloqueio ou aumento do acoplamento eletrotônico, respectivamente, a atividade espontânea foi abolida ou aumentada, de acordo com registros eletrofisiológicos.

Para estudar a origem das OMR (>70 Hz), que geralmente precedem o início das crises focais, Traub e cols. (2001) utilizaram registros intra e extracelulares de OMR em fatias hipocâmpais de ratos. Com este intuito foi realizada: 1) Aplicação de TMA; 2) Aplicação de carbacol (agonista colinérgico) e 3) Aplicação de solução hipertônica de K^{+} na geração de atividade ictal. Foram encontradas OMR antes, durante e após as salvas de disparos epileptiformes, assim como sobrepostas às oscilações gama (30-70 Hz) quando induzidos por carbacol ou K^{+} hipertônico. Os autores notaram que as OMR que ocorriam em fatias hipocâmpais eram dependentes das JC, mas não da neurotransmissão química.²⁸

Utilizando um modelo de baixo-magnésio para induzir crises espontâneas, Khosravani e cols. (2005), investigaram a evolução temporal das OMR através de registros de campo extracelular de cinco ou mais episódios de crise em fatias hipocâmpais que desenvolveram crises. Os dados demonstraram uma tendência a um aumento linear na amplitude do espectro de potência nas bandas de frequência de sub-oscilações (*subripple* 0-100 Hz), oscilações (*ripple* 100-200 Hz) e oscilações rápidas (*fast ripple* 200-300 Hz) durante o tempo correspondente a uma transição da fase pré-ictal para ictal. Esses padrões temporais dinâmicos das OMR demonstram distintas alterações nas atividades de oscilações e oscilações rápidas durante a transição para o início de crise. Sua caracterização poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos celulares que iniciam as crises.¹⁶

Com o objetivo de estudar a extensão da área de geração de OMR e o papel destas nas crises do córtex epileptogênico foram realizados registros da atividade elétrica na camada granular do giro dentado, CA1 e subículo em fatias hipocâmpais de ratos. Foi observado OMR localizadas em áreas discretas diferentes do grupo controle que não apresentou nenhuma atividade semelhante à OMR. Posteriormente, com a aplicação de bicuculina, antagonista dos receptores de GABA(A), a área de geração de OMR se ampliou. A partir destes dados o autor inferiu que grupos de neurônios altamente interconectados são capazes de vencer o *feedback* inibitório dos interneurônios, resultando

na geração de bursts epileptiformes, eventualmente levando a atividade de crise.⁵

Substâncias que provocam abertura das JC promovem uma hypersincronia neuronal semelhante aos modelos de tetanização. A tetanização repetida de 100 Hz a cada 10 minutos em fatias de córtex piriforme de ratos produz descargas epiléticas no núcleo endopiriforme.²⁰ Em fatias hipocâmpais e parahipocâmpais, a tetanização de 60-100 Hz a cada 10 minutos produz atividade epilética, que pode ser bloqueada com octanol, propionato de sódio, ácido glicirretínico e CBX, o que sugere o papel das JC nas crises epiléticas.²³

Simulação Computacional

Traub e cols. (2001) realizaram simulações computacionais utilizando modelos de células piramidais e interneurônios, JC entre axônios, com e sem bloqueio de sinapses químicas. Os resultados encontrados são consistentes com os dados *in vivo* e *in vitro* e indicam que as OMR, que precedem as crises, dependem das JC. Os autores sugerem, portanto, que as JC podem estar envolvidas na geração da atividade rápida que precede o início das crises, ou talvez até iniciando propriamente as crises. Dados de simulação concluem que as interações eletrotônicas são importantes tanto para sincronia neuronal como para a estabilização dos padrões de disparo em salvas, pelo fato de que mesmo acoplamentos fracos convertem picos em disparos em salva contribuindo para a hiperexcitabilidade.²⁸

EXPRESSÃO DAS CONEXINAS NAS CRISES

Modelos animais

A expressão das conexinas-32, 43 e 36 foi analisada no foco epilético e na área análoga contralateral, após crises induzidas por 4-AP em ratos. Um significativo aumento na expressão destas conexinas após repetidas crises foi observado tanto no foco principal quanto na área análoga contralateral. Isto poderia ser uma indicação do aumento das JC entre diferentes tipos de células (glia/glia, glia/neurônio e neurônio/neurônio) no foco epilético. Além disso, o aumento na expressão das conexinas após repetidas crises sugere o papel da JC na exacerbação das crises.¹² Da mesma forma, Szenté e cols. (2002) investigaram a expressão de conexinas no neocórtex de ratos e observaram que após a administração de 4-AP houve um aumento dos níveis de RNAm das conexinas-32 e 43 no foco ictal. Com estes resultados, os autores concluem que a comunicação elétrica via JC colabora com a sincronia neuronal na atividade epilética do neocórtex de ratos.²⁷

Estudo em humanos

Recentemente vários estudos têm estabelecido que determinadas patologias e injúrias estão associadas com

mudanças na expressão das conexinas e acoplamento intercelular, incluindo as doenças neurodegenerativas. Entretanto é difícil discriminar se estas modificações na expressão das conexinas são a causa ou a consequência destas. Além disso, os resultados destes estudos são esparsos e muitas vezes contraditórios.

De acordo com Perez-Velazquez e cols. (1994), os níveis de RNAm das conexinas encontram-se elevados em tecidos de pacientes epiléticos, sugerindo o envolvimento das JC nas epilepsias humanas.²¹

Em um estudo sobre a regulação dos níveis de conexinas-43 da JC astrocitária e sua correlação com crises epiléticas generalizadas na epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) foi investigado se a astrocitose ocorre na ELTM e se esta é acompanhada de um aumento na comunicação astrocitária através de uma maior regulação da proteína conexina-43. Os resultados desse estudo indicaram que na ELTM houve um aumento nos níveis de marcação imunohistoquímica da conexina-43 comparado com hipocampus controle humanos. Os autores sugerem que as JC podem ter um papel na geração de crises e que essa ampla regulação pode levar a um estado de crises generalizadas na progressão da ELTM.¹⁰

Com o objetivo avaliar se uma alteração na expressão das JC no tecido epilético têm papel crítico na origem e propagação de crises, Collignon e cols. (2006) compararam o nível de expressão das conexinas-32, 36 e 43 no hipocampo de pacientes com ELTM e indivíduos não epiléticos. Foi observado que pacientes epiléticos apresentam menor nível de conexina-32, porém a conexina-43 foi mais expressa em pacientes epiléticos que em indivíduos não epiléticos. Os níveis de conexina-32 permaneceram inalterados nestes pacientes quando comparados aos controles.⁹

Já, no estudo de Aronica e cols., sobre a expressão das conexinas-43 e 32 em epilepsia associado a tumores cerebrais e em córtex epilético perilesional, foi observado uma alta expressão das proteínas conexinas nos tumores de baixo grau e em reações astrocitárias peritumorais o que levam os autores a sugerirem que essas reações contribuem para as crises relacionadas com os tumores.¹ Além disso, estudo em pacientes com epilepsia mioclônica juvenil forneceu evidências de associação alélica e genotípica entre este tipo de epilepsia e o alelo Cx 36 C588T (gene da conexina-36).¹⁵

CONCLUSÃO

Dados obtidos do estudo de modelos de epilepsia *in vivo*, *in vitro*, de simulação computacional e em humanos sugerem que as JC possam ter papel importante na indução, manutenção e controle da duração de crises epiléticas. Foi observado que, tanto em humanos quanto em animais, OMR podem preceder o início das crises, assim como

podem ocorrer sobrepostas a *salvas de disparos ictais e interictais*. Além disso, drogas capazes de abrir, ou bloquear JC aumentam ou diminuem, respectivamente, a duração das crises. Portanto drogas capazes de bloquear JC, como a CBX poderiam representar um alvo apropriado para o desenvolvimento de novas drogas antiepiléticas. Por fim, alguns estudos mostram aumento na expressão de certas isoformas de conexinas após a indução de crises. Entretanto é difícil discriminar se estas alterações na expressão gênica de certas conexinas estão relacionadas à causa ou à consequência das crises. Portanto, novas pesquisas são necessárias para o entendimento de como, quando e porque mudanças na expressão das conexinas em células nervosas e, talvez em glias, podem interferir na atividade de crises epiléticas.

REFERÊNCIAS

1. Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, Leenstra S, Yankaya B, and 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.
2. Bennett MV, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, and Saez JC. Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* 1991;6:305-20.
3. Bennett MVL. Electrical transmission: a functional analysis and comparison with chemical transmission. In: Kandel, E Cellular biology of neurons. Baltimore: Williams and Wilkins; 1977.
4. Bennett MVL. Permeability and structure of electronic junctions and intracellular movement of tracers. New York: Springer; 1973.
5. Bragin A, Mody I, Wilson CL, and Engel J, Jr. Local generation of fast ripples in epileptic brain. *J Neurosci* 2002;22:2012-21.
6. Bruzzone R, White TW, and Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 1996;238:1-27.
7. Carlen PL P-VJ, Valiante TA, and Jahromi SS BB. Electric coupling in epileptogenesis. New York; 1996.
8. Carlen PL, Skinner F, Zhang L, Naus C, Kushnir M, and Perez Velazquez JL. The role of gap junctions in seizures. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;32:235-41.
9. Collignon F, Wetjen NM, Cohen-Gadol AA, Cascino GD, Parisi J, Meyer FB, Marsh WR, Roche P, and Weigand SD. Altered expression of connexin subtypes in mesial temporal lobe epilepsy in humans. *J Neurosurg* 2006;105:77-87.
10. Fonseca CG, Green CR, and 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.
11. Furshpan EP, DD. Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol* 1959;145:289-325.
12. Gajda Z, Gyengesi E, Hermes E, Ali KS, and Szenté M. Involvement of gap junctions in the manifestation and control of the duration of seizures in rats *in vivo*. *Epilepsia* 2003;44:1596-1600.
13. Gajda Z, Hermes E, Gyengesi E, Szupera Z, and Szenté M. The functional significance of gap junction channels in the epileptogenicity and seizure susceptibility of juvenile rats. *Epilepsia* 2006;47:1009-22.
14. Gigout S, Louvel J, and 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;69:15-29.
15. Hempelmann A, Heils A, and Sander T. Confirmatory evidence for an association of the connexin-36 gene with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Res* 2006;71:223-8.
16. Khosravani H, Pinnegar CR, Mitchell JR, Bardakjian BL, Federico P, and Carlen PL. Increased high-frequency oscillations precede *in vitro* low-Mg seizures. *Epilepsia* 2005;46:1188-97.

17. Kohling R, Gladwell SJ, Bracci E, Vreugdenhil M, and Jefferys JG. Prolonged epileptiform bursting induced by 0-Mg(2+) in rat hippocampal slices depends on gap junctional coupling. *Neuroscience* 2001;105:579-87.
18. Laird DW, Castillo M, Kasprzak L. Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J Cell Biol* 1995;131:1193-203.
19. Lent R. Cem bilhões de neurônios – conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: editora Atheneu; 2001.
20. Pelletier MR and Carlen PL. Repeated tetanic stimulation in piriform cortex in vitro: epileptogenesis and pharmacology. *J Neurophysiol* 1996;76:4069-79.
21. Perez-Velazquez JL, Valiante TA, and 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.
22. Perez Velazquez JL and Carlen PL. Gap junctions, synchrony and seizures. *Trends Neurosci* 2000;23:68-74.
23. Rafiq A, DeLorenzo RJ, and Coulter DA. Generation and propagation of epileptiform discharges in a combined entorhinal cortex/hippocampal slice. *J Neurophysiol* 1993;70:1962-74.
24. Rash JE, Staines WA, Yasumura T, Patel D, Furman CS, Stelmack GL, and Nagy JJ. Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7573-8.
25. Rouach N, Avignone E, Meme W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F, and Giaume C. Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 2002;94:457-75.
26. Rozental R, Giaume C, and Spray DC. Gap junctions in the nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;32:11-15.
27. Sente M, Gajda Z, Said Ali K, and Hermes E. Involvement of electrical coupling in the in vivo ictal epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the neocortex. *Neuroscience* 2002;115:1067-78.
28. Traub RD, Whittington MA, Buhl EH, LeBeau FE, Bibbig A, Boyd S, Cross H, and 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;42:153-70.
29. Venance L, Rozov A, Blatow M, Burnashev N, Feldmeyer D, and Monyer H. Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10260-5.

Correspondência para:

João Pereira Leite
Depto. Neurociências e Ciências do Comportamento
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
Av. Bandeirantes, 3900
CEP 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil
Tel./Fax: (016)3602-2556
E-mail: <jpleite@fmrp.usp.br>