



**UNICAMP**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**KÁTIA SILVA DE BRITO**

**Investigação comportamental e molecular em *zebrafish* (*Danio rerio*)  
exposto a dose subconvulsivante de Pentilenotetrazol (PTZ) com  
objetivo de indução ao modelo de *Kindling*.**

CAMPINAS

2018

KÁTIA SILVA DE BRITO

Investigação comportamental e molecular em *zebrafish* (*Danio rerio*) exposto a dose subconvulsivante de Pentilenotetrazol (PTZ) com objetivo de indução ao modelo de *Kindling*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, área de concentração Genética Médica.

ORIENTADOR: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Vianna Maurer Morelli

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA  
ALUNA KÁTIA SILVA DE BRITO, E ORIENTADA PELA  
PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup> CLAUDIA VIANNA MAURER MORELLI.

CAMPINAS

2018

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2014/15640-8; FAPESP, 2013/07559-3

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B777i Brito, Kátia Silva de, 1990-  
Investigação comportamental e molecular em *zebrafish* (*Danio rerio*) exposto a dose subconvulsivante de Pentilenotetrazol (PTZ) com objetivo de indução ao modelo de *Kindling* / Kátia Silva de Brito. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Claudia Vianna Maurer Morelli.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Zebrafish. 2. Epilepsia. 3. Excitação neurológica. 4. Pentilenotetrazol. I. Maurer-Morelli, Cláudia Vianna, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Behavioral and molecular investigation in the *zebrafish* (*Danio rerio*) exposed to subconvulsive doses of Pentylene tetrazole: aiming to establish a kindling protocol

**Palavras-chave em inglês:**

Zebrafish

Epilepsy

Kindling, Neurologic

Pentylene tetrazole

**Área de concentração:** Genética Médica

**Titulação:** Mestra em Ciências

**Banca examinadora:**

Claudia Vianna Maurer Morelli [Orientador]

Fábio Rogério

Danielle do Carmo Ferreira Bruno

**Data de defesa:** 19-12-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

# **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**KÁTIA SILVA DE BRITO**

---

**ORIENTADOR: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. CLAUDIA VIANNA MAURER MORELLI**

---

## **MEMBROS:**

**1. PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. CLAUDIA VIANNA MAURER MORELLI**

**2. PROF. DR. FÁBIO ROGÉRIO**

**3. PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup> DANIELLE DO CARMO FERREIRA BRUNO**

---

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data: 19 de dezembro de 2018**

## **DEDICATÓRIA**

À minha querida e amada família: Juarez (em memória), Aparecida, e Samuel.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, por serem minhas maiores inspirações. Ao meu pai, que mesmo ausente em vida, sempre se fez presente em meus pensamentos. Poder estudar a doença com a qual ele conviveu boa parte de sua vida é uma honra imensa para mim, e tem sido o meu maior incentivo desde o início. À minha mãe por estar ao meu lado sempre, me aconselhar, me ouvir nas horas difíceis, enfim, por ser o meu suporte na vida.

A profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli, por toda a paciência, incentivo, e por sempre acreditar em mim. A Profa. Dra. Cláudia honra em todos os quesitos o seu papel de orientadora e foi uma verdadeira tutora para mim, desde os tempos de estágio na graduação, quando a conheci.

A toda equipe do Laboratório Zebrafish, por toda a parceria, aprendizado e auxílio sempre que solicitado, durante todos estes anos. Agradeço também à equipe do Laboratório de Genética Molecular e ao Departamento de Genética Médica da FCM.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (2014/15640-8), CEPID-BRAINN (2013/07559-3) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que permitiram que esse estudo fosse realizado.

## RESUMO

As epilepsias são doenças neurológicas crônicas comuns onde o cérebro passa a funcionar de forma anormal levando às crises epiléticas espontâneas. Grande parte da compreensão sobre os aspectos neurobiológicos das epilepsias humanas advém de modelos animais, em especial os modelos de epileptogênese. Os modelos animais mais utilizados para estudo das epilepsias são os roedores, porém, nas últimas décadas, o *zebrafish* (*Danio rerio*) tem sido o modelo de escolha em muitos estudos devido suas inúmeras vantagens para experimentação científica, principalmente nas investigações genéticas. Recentemente foi demonstrado que o *zebrafish* é capaz de apresentar padrão comportamental característico, alterações moleculares e eletrográficas que mimetizam as crises epiléticas agudas, fazendo do *zebrafish* um modelo favorável para investigações na área das epilepsias. Apesar de suas vantagens, ainda não há a descrição de que esse animal possa se tornar cronicamente epilético. Nesse sentido, justifica-se empregar o modelo do abrasamento (*kindling*) para essa investigação. O abrasamento é um processo no qual o cérebro de um modelo animal é estimulado elétrica ou quimicamente de modo frequente criando assim, condições que aumentam a susceptibilidade do cérebro a se tornar cronicamente epilético. O modelo de *kindling* já é bem explorado em roedores, e oferece uma grande oportunidade de investigação dos mecanismos que permeiam a epileptogênese. Este estudo exploratório teve como finalidade aplicar um protocolo de *kindling* químico no *zebrafish* por meio da administração de doses subconvulsivantes de *pentilenotetrazol* (PTZ) na concentração de 7,5 mM por 2 minutos durante 60 dias com posterior análise comportamental e molecular, investigando os níveis de transcritos dos genes: *c-fos*, *fosb*, *cox2*, *klrn* e *il1b* por meio da PCR em tempo real em quatro tempos distintos. A análise comportamental mostrou que os animais não apresentaram alterações significativas do comportamento e que pudessem caracterizar uma crise epilética tônico-clônica com posterior perda de postura completa como já descrito na literatura para o modelo do *zebrafish*. Na análise molecular houve um aumento significativo da expressão do gene *c-fos* no 5º e 60º dias de experimento em comparação com o grupo controle indicando que há um aumento de recrutamento neuronal, mas que não repercute em epilepsia. O gene *klrn* mostrou-se menos expresso que o grupo controle no 15º dia.

Outros genes investigados não apresentaram alterações significativas. Nossos resultados mostram que *zebrafish* não apresentou crises epiléticas espontâneas o que pode ser indicativo de resistência ao tratamento. A confirmação desses achados e a investigação dos mecanismos que conferem ao *zebrafish* uma maior resistência ao abrasamento, podem contribuir para a identificação de novos alvos para o tratamento das epilepsias em humanos.

Palavras-chave: Zebrafish; Epilepsia; Excitação neurológica; Pentilenotetrazol

## ABSTRACT

Epilepsies are common neurological disorders in which brain activity became abnormal, leading to unprovoked seizures. The majority of our understanding of neurobiological aspects of human epilepsies come from the animal models, especially from the epileptogenesis models. Zebrafish (*Danio rerio*) has been chosen for many studies because of its advantages for scientific investigation, mainly in genetic studies. The most common animal models for studying epilepsy are rodents. Recently, zebrafish has been shown to be able to present behavior pattern, molecular and electrographic modifications that mimic acute seizures, making zebrafish a promising model for epilepsy studies. Despite its advantages, there is no information on whether this animal can become chronically epileptic. In this way, it is reasonable to use the kindling method in order to create a chronic epilepsy zebrafish model. Kindling is a process in which the brain of an animal model is subsequently stimulated, electrically or chemically, increasing the brain's susceptibility to becoming chronically epileptic. The kindling model is well explored in rodents and offers a great opportunity to investigate the mechanisms underlying the epileptogenesis. This exploratory study aimed to apply a chemical kindling protocol in zebrafish through a daily administration of subconvulsivant doses of pentylenetetrazole (PTZ) at 7.5 mM for 2 minutes during 60 days followed by behavioral and molecular analyses, as well as by investigating the levels of transcripts of the genes: *c-fos*, *fosb*, *cox2*, *kln* and *il1b* by real-time PCR at four different time-points. The behavioral analyses showed that the animals did not present significant seizure-behavior modifications. In molecular analysis, there was a significant increase in the *c-fos* expression at the 5th and 60th days of the treatment indicating that the increased neuronal recruitment, but that does not reproduced seizures. The *kln* gene was shown to be down-regulated on the 15th day. The other investigated genes did not present significant alterations. Our results showed that zebrafish did not present spontaneous seizures during the treatment, which might indicate some resistance to the PTZ-treatment. Further studies will be necessary to confirm the zebrafish's kindling resistance and to investigate the mechanisms involved in that, which may contribute to the identification of new targets for treating epilepsy in humans.

Keywords: *Zebrafish*; Epilepsy; Kindling, neurologic; Pentylenetetrazole

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação das crises epiléticas. ....	15
Figura 2 - Comparação entre a definição de epileptogênese, no passado e atualmente. ....	18
Figura 3 - Morfologia do <i>zebrafish</i> . ....	23
Figura 4: Mudanças na composição celular do nicho neurogênico relacionadas ao envelhecimento no cérebro adulto do <i>zebrafish</i> . ....	27
Figura 5 - Ilustração representativa do protocolo experimental. ....	33
Figura 6 - Representação do tempo (em segundos) em que os animais do grupo teste expostos a dose subconvulsivante de Pentilenotetrazol (PTZ) 7,5mM, levaram para alcançar uma das fases de crise epilética, descritas em Mussulini et al, 2013. ....	39
Figura 7 - Representação dos animais que alcançaram a fase 5 (movimentos tônico-clônicos com posterior perda de postura) segundo Mussulini et al, 2013. ....	40
Figura 8 - Quantificação relativa de RNA mensageiro do gene <i>cfos</i> . ....	3
Figura 9 - Análise temporal do transcrito do gene <i>cfos</i> entre os grupos 05, 15, 30 e 60 dias. ....	43
Figura 10 - Quantificação relativa de RNA mensageiro do gene <i>cox2</i> . ....	44
Figura 11 - Quantificação relativa de RNA mensageiro do gene <i>fosb</i> . ....	44
Figura 12 - Quantificação relativa de RNA mensageiro do gene <i>il1β</i> . ....	45
Figura 13 - Quantificação relativa de RNA mensageiro do gene <i>klrn</i> . ....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fases do padrão comportamental durante crise epiléptica em <i>zebrafish</i> adulto: .....	34
Tabela 2: Quantificação relativa do mRNA do gene <i>cfos</i> . .....	41
Tabela 3: Quantificação relativa do mRNA do gene <i>cox2</i> . .....	41
Tabela 4: Quantificação relativa do mRNA do gene <i>fosb</i> . .....	42
Tabela 5: Quantificação relativa do mRNA do gene <i>il1b</i> . .....	42
Tabela 6: Quantificação relativa do mRNA do gene <i>kalirin</i> . .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
EEG	Eletroencefalograma
AVC	Acidente Vascular Cerebral
SNC	Sistema Nervoso Central
IPI	Insulto Precipitante Inicial
SE	<i>Status Epilepticus</i>
TBI	<i>Traumatic Brain Injury</i> (traumacrânioencefálico)
DAE	Drogas Anti-Epilépticas
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
ELTM	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial
PTZ	Pentilenotetrazol
hpf	horas pós-fertilização
dpf	dias pós-fertilização
IEG	<i>Immediate Early Gene</i>
LTP	<i>Long Term Potentiation</i>
GFAP	proteína acídica fibrilar glial

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 Características e conceitos gerais das epilepsias .....	14
1.2 Epileptogênese .....	17
1.3 Modelos experimentais de epileptogênese .....	19
1.3.1 <i>Status epilepticus</i> .....	20
1.3.2 <i>Kindling</i> .....	21
1.3.3 Espécies animais para estudo da epileptogênese .....	21
1.4 O <i>zebrafish</i> .....	22
1.4.1 Tipos celulares do SNC do <i>zebrafish</i> : um paralelo com o cérebro humano...24	
1.4.2 <i>Zebrafish</i> como modelo de crises epiléticas.....27	
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1 Objetivo principal .....	30
2.2 Objetivos específicos .....	30
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 Comitê de Ética .....	31
3.2 Aquisição, manutenção e cuidados dos animais. ....31	
3.3 Definição da curva dose-resposta e indução de crise epilética através da administração de Pentilenotetrazol (PTZ).....31	
3.4 Análise comportamental e extração dos cérebros .....	34
3.5 Análise molecular .....	35
3.5.1 Extração de RNA Total.....35	
3.5.2 Eletroforese em gel de agarose para análise da qualidade do RNA.....36	
3.5.3 RT- PCR (Transcriptase Reversa) .....	36
3.5.4 PCR em Tempo Real .....	36
<b>3.6 Análise estatística</b> .....	<b>37</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
4.1 Comportamento .....	38
4.2 Expressão gênica .....	41
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>51</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>
<b>8. ANEXO</b> .....	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Características e conceitos gerais das epilepsias

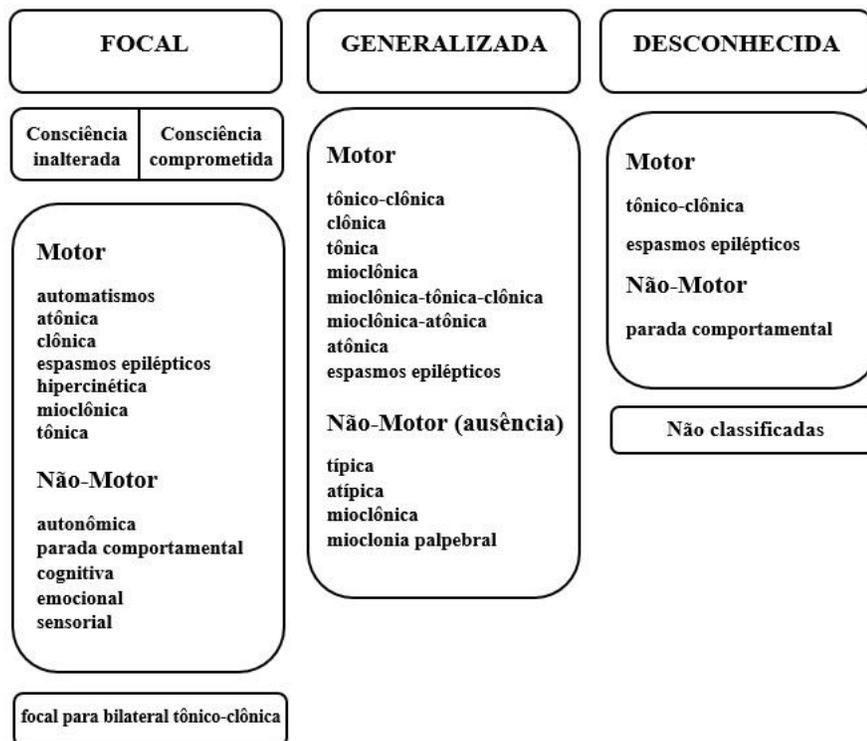
As epilepsias são doenças neurológicas crônicas e frequentes, que acometem cerca de 1% da população mundial – aproximadamente 50 milhões de pessoas, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018). Porém estima-se que estes dados estejam desatualizados, e estudos mais recentes indicam que a estimativa mundial seja de 65 milhões de pessoas (Ngugi *et al.*, 2010; Thurman *et al.*, 2011). Cerca de 80% dos pacientes afetados vivem em países de média ou baixa renda, muitas vezes não obtendo acesso ao tratamento adequado. Além disso, é estimado que cerca de 30% das pessoas que sofrem com epilepsia não respondem ao tratamento clínico, sendo possíveis candidatos a abordagem cirúrgica (OMS, 2018).

A definição e classificação de epilepsias e crises epiléticas é um trabalho em constante movimento, o qual teve início em 1964. Esta constante atualização é de extrema importância, pois acompanha as descobertas do meio científico em relação às epilepsias, definindo um padrão para o diagnóstico da doença e acarretando em um tratamento mais adequado (Falco-Walter *et al.*, 2018).

Em 2014, a Comissão de Classificação e Terminologia da *International League against Epilepsy* (ILAE) publicou um guia clínico-prático para a definição de epilepsia e, em 2017, uma nova classificação para os tipos epilepsia e de crises epiléticas. No modelo atualizado de 2014, as epilepsias foram definidas como um conjunto de doenças caracterizadas por predisposição de células neuronais em gerar crises epiléticas espontâneas e recorrentes e por suas consequências neurológicas, cognitivas e psicossociais (Falco-Walter *et al.*, 2018; Fisher *et al.*, 2014; Fisher *et al.*, 2005). Portanto, segundo a ILAE, a epilepsia é diagnosticada na presença das seguintes condições: (I) pelo menos duas crises epiléticas não provocadas (ou duas crises reflexas) em um período de intervalo maior que 24 horas; (II) uma crise não provocada (ou uma crise reflexa) e probabilidade de ao menos 60% de ocorrência de uma nova crise após duas crises não provocadas, nos próximos 10 anos; ou (III) síndrome epilética (Fisher *et al.*, 2014).

As crises epilépticas são ocorrências que refletem uma disfunção temporária de um conjunto de neurônios, onde há desequilíbrio dos mecanismos excitatórios e inibitórios do cérebro, provocando descargas elétricas excessivas (Fisher *et al.*, 2017). As crises epilépticas se apresentam de diferentes formas e são classificadas de acordo com o seu início, podendo ser focais, quando as descargas ocorrem em uma região específica do cérebro e em apenas um hemisfério; generalizadas, quando as descargas se originam em regiões diferentes do cérebro, podendo se alastrar para regiões distantes do foco de início e acometer os dois hemisférios, não necessariamente atingindo todo o córtex; ou desconhecidas, quando não se é possível detectar o início da crise (Fisher *et al.*, 2017; Falco-Walter, 2018) (Figura 1). Importante frisar que a epilepsia não se resume apenas às crises epilépticas, visto que isoladas, elas não caracterizam a epilepsia, e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 10% da população mundial podem apresentar uma crise epiléptica ao decorrer de sua vida, sem necessariamente desenvolver epilepsia (OMS, 2018).

Figura 1 - Classificação das crises epilépticas



Fonte: Liga Internacional de Epilepsia - ILAE, 2017. Tradução e adaptação da autora.

Para entendermos como funciona o cérebro em estado epiléptico, primeiramente é preciso compreender os mecanismos de comunicação neuronal em um cérebro sadio. No sistema nervoso central (SNC) existem dois tipos de sinapses - as sinapses elétricas, nas quais há comunicação direta entre os neurônios, com passagem de correntes iônicas através das junções comunicantes (ou junções *gap*). Já as sinapses químicas são mediadas por neurotransmissores que estão presentes nas vesículas pré-sinápticas e, que perante um estímulo, são liberados nas fendas sinápticas e se ligam a receptores específicos na membrana pós-sináptica. Se o neurotransmissor for do tipo excitatório irá desencadear despolarização da membrana; no entanto, se for do tipo inibitório, desencadeará hiperpolarização (Gazzaniga, 1998). O ácido gama-aminobutírico (GABA) possui atividade inibitória enquanto o glutamato possui atividade excitatória. O equilíbrio entre esses dois neurotransmissores é essencial para manter o funcionamento normal da comunicação neuronal (Petroff, 2002). Dentre os diferentes neurotransmissores existentes no SNC, o GABA e o glutamato são os mais comumente relacionados às epilepsias, sendo as crises epiléticas decorrentes, ao menos em parte, de desequilíbrio na regulação das sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas, gerando descargas elétricas em excesso (Alvestad *et al.*, 2011; Rowley *et al.*, 2012).

Como descrito anteriormente, de acordo com a classificação das crises epiléticas, as epilepsias são classificadas como: focais, generalizadas, focais e generalizadas combinadas e desconhecidas. A epilepsia é considerada desconhecida quando não há informações suficientes para o diagnóstico, o que pode ocorrer por vários motivos, por exemplo, indisponibilidade de acesso aos exames de eletroencefalograma (EEG), ou um EEG sem alterações epileptiformes (Scheffer *et al.*, 2017). Atividades epileptiformes são alterações elétricas detectáveis através do exame de EEG, que se apresentam diferentes do padrão normal de atividade elétrica cerebral (Westmoreland, 1996).

De acordo com as normativas da ILAE, 2017, as epilepsias possuem seis grupos etiológicos não hierárquicos, sendo que o mesmo indivíduo pode estar classificado em mais de uma categoria. É de extrema importância que seja identificado qual a etiologia das epilepsias, pois esta irá ditar qual o melhor tratamento a ser aplicado (Scheffer *et al.*, 2017). São elas:

- Estrutural: causada por lesão anatomicamente detectável em alguma região do cérebro, por exemplo: traumatismos, tumores, acidente vascular cerebral (AVC) ou infecções do SNC; ou até mesmo genéticas, em consequência de malformações cerebrais;
- Genética: quando a epilepsia resulta de mutações genéticas conhecidas, ou que se presume que estão relacionadas à epilepsia;
- Infecção: é a causa mais comum de epilepsia no mundo. Quando a epilepsia se desenvolve como consequência de uma doença infecciosa ocorrida previamente, por exemplo: meningite. Não é considerado epilepsia quando o indivíduo apresenta crises epiléticas na fase aguda da doença infecciosa.
- Metabólica: ocorre em consequência de uma doença metabólica conhecida, tais como porfirias, uremias, aminoacidopatias, etc.;
- Imune: ocorre em consequência de uma doença imune;
- Desconhecida: quando não há nenhuma causa provável ou lesão detectável através dos métodos diagnósticos atualmente disponíveis.

O processo que torna o cérebro cronicamente epilético ainda não é totalmente compreendido, mas está intimamente relacionado com a manifestação da doença. É chamado de epileptogênese, e atualmente é uma das áreas de maior interesse de estudo das epilepsias (Pitkanen *et al.*, 2015; Löscher & Brandt, 2010).

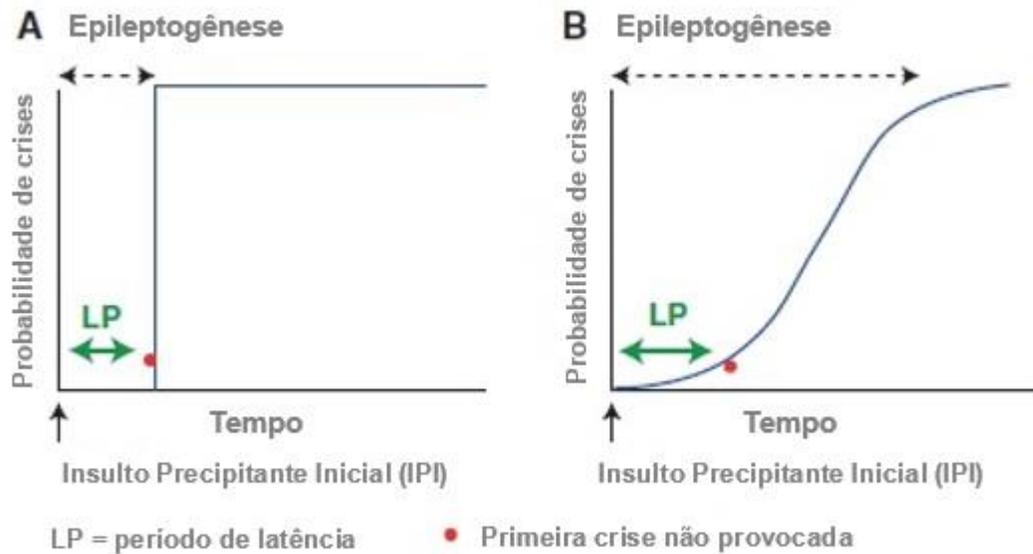
## 1.2 Epileptogênese

A epileptogênese é um processo no qual um cérebro assintomático torna-se capaz de gerar crises epiléticas espontâneas e recorrentes. Pode ocorrer devido a um insulto precipitante inicial (IPI), tais como trauma cranioencefálico, AVC (acidente vascular cerebral) infecções, tumores, doenças neurodegenerativas e também quando há uma predisposição genética (Pitkanen *et al.*, 2015).

No passado, o conceito de epileptogênese era de que, tratava-se de um evento que ocorreria após o IPI, podendo durar meses ou anos até a manifestação da primeira crise epilética espontânea, sendo considerado o período de latência entre estes dois eventos (Pitkanen & Lakasiuk, 2011). Hoje sabe-se que se trata de uma série de

alterações que continua a ocorrer mesmo após a primeira crise epilética se manifestar. Este novo conceito é baseado em evidências de que, com o passar do tempo, as crises aumentam em relação a frequência e severidade, indicando uma constante modificação no cérebro (Pitkanen *et al.*, 2015) (Figura 2).

Figura 2 - Comparação entre a definição de epileptogênese no passado e atualmente.



Fonte: Pitkanen, 2015. (A) Referindo-se apenas como o período de latência entre a lesão inicial e aparecimento da primeira crise epilética espontânea. (B) Conceito atual de epileptogênese: através de evidências de aumento gradativo do número de crises epiléticas e sua severidade, atualmente admite-se que a epileptogênese seja um processo contínuo. Tradução e adaptação da autora.

O processo de epileptogênese ainda não é totalmente conhecido, mas sabe-se que há uma cascata de reações que se apresentam como uma tentativa do cérebro em se recuperar de uma lesão e formar novas redes de comunicação. Uma evidência disto, é que nem todos os indivíduos que sofrem um IPI, de fato desenvolvem epilepsia (Loscher, 2010). O conhecimento que se tem sobre a epileptogênese advém de estudos experimentais com modelos animais, das alterações histopatológicas encontradas em espécimes cirúrgicos de pacientes com epilepsia, bem como pelas alterações morfológicas em exames de imagem, como a ressonância magnética (Sierra

*et al.*, 2015; Huberfeld *et al.*, 2015). Dentre as alterações mais comumente encontradas, destaca-se os achados no hipocampo, área do cérebro mais acometida principalmente na Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM), tipo mais comum de epilepsia em adultos e frequentemente refratária ao tratamento medicamentoso, e na qual pode haver presença de esclerose hipocampal (Pitkanen & Sutula, 2002; Huberfeld *et al.*, 2015). Estas alterações são: plasticidade sináptica e axonal, neurodegeneração, neurogenese, gliose, brotamento das fibras musgosas (*sprouting*) inflamação, quebra da barreira hematoencefálica e angiogênese (Pitkanen & Sutula, 2002). Porém, estes achados em humanos referem-se a eventos já ocorridos, o que dificulta o monitoramento do processo epileptogênico no cérebro humano, antes que a primeira crise epiléptica espontânea se manifeste. Neste ponto, os modelos animais são de grande valia, pois permitem acompanhar a epileptogênese experimentalmente.

### **1.3 Modelos experimentais de epileptogênese**

Existem diversas formas para estudar a epileptogênese em modelos animais. Modelos crônicos tais como *Status Epilepticus* e *Kindling* foram criados com intuito de reproduzir as mesmas características observadas na ELT. Mesmo com abordagens diferentes, estes modelos têm como objetivo monitorar o processo epileptogênico e reproduzir a fenomenologia (insulto precipitante inicial – período de latência/epileptogênese – crise epiléptica), observando alterações moleculares e celulares, afim de compará-las com as alterações observadas em humanos (Löscher, 2017; Kandravicius *et al.*, 2014). Além disso, estes modelos permitem uma ampla investigação genética, como por exemplo a investigação de potenciais biomarcadores de epilepsias, e / ou auxiliando no desenvolvimento de drogas anti-epilépticas (DAE) (Engel *et al.*, 2013).

Atualmente fala-se em uma estratégia de anti-epileptogênese, com objetivo de modificar ou prevenir a epileptogênese, impedindo assim a progressão da epilepsia. Apesar de ainda pouco explorada, tem despertado interesse no meio científico, devido o possível potencial no tratamento das epilepsias (Löscher & Brandt, 2010; Terrone *et al.*, 2016).

### 1.3.1 *Status Epilepticus*

O modelo de *Status Epilepticus* (SE) é uma abordagem que mimetiza essa condição observada em algumas epilepsias, como a Epilepsia do Lobo Temporal - ELT. Em humanos, o SE é caracterizado como uma crise epiléptica intensa e de longa duração (a ILAE classifica como SE crises epilépticas com duração superior a cinco minutos) e que, somente é interrompida após assistência médica. É resultante da falha de mecanismos responsáveis pelo início ou fim das crises, podendo levar a sérias consequências como lesões/alterações de redes neuronais e morte neuronal, dependendo do tipo e duração da crise (Trinka *et al.*, 2015).

No modelo experimental de SE observa-se que após a indução de uma única crise epiléptica de duração prolongada, há um período de latência que pode variar de dias a semanas, até o animal começar a apresentar crises epilépticas espontâneas. As alterações neuropatológicas observadas nesses modelos animais de SE remetem as mesmas observadas em humanos na ELTM (Gorter *et al.*, 2015).

Em roedores, as induções das crises podem ser realizadas por meio de eletroestimulação ou por administração de agentes químicos, sendo os mais utilizados o ácido cainico e a pilocarpina (Löscher, 2017). O ácido cainico é um análogo do L-glutamato que se liga aos receptores ionotrópicos de cainato, um tipo de receptor glumamatérgico. A administração pode ser feita através de injeções sistêmicas, ou diretamente em estruturas mesiais do lobo lateral, como hipocampo e amígdala. Após a exposição a este agente químico, pode ser observada uma hiperexcitação prolongada, despolarização e eventualmente morte celular (Lévesque & Avoli, 2013). Já a pilocarpina é agonista de receptores colinérgicos muscarínicos. A ligação da pilocarpina nestes receptores causa um desequilíbrio funcional entre as sinapses inibitórias e excitatórias, resultando em um acúmulo de glutamato, que culmina em um SE límbico (Curia *et al.*, 2008).

### **1.3.2 Kindling**

*Kindling* é um modelo experimental no qual o cérebro é modelado para estudo crônico de epilepsias. Descrito originalmente em 1969 por Goddard e colaboradores, o *kindling* é um fenômeno no qual a aplicação de estímulos subconvulsivantes consecutivas vezes em modelos animais, faz com que o cérebro desenvolva atividade epiléptica (Goddard *et al.*, 1969). Há duas abordagens de modelo de *kindling* - químico e elétrico. O modelo clássico proposto por Goddard consiste na aplicação de estímulos elétricos em regiões do cérebro como córtex do giro do cíngulo e sistema límbico-olfatório. No entanto, estudos posteriores focaram mais em regiões como amígdala e hipocampo, pois desta maneira é possível mimetizar as crises que são observadas na ELTM, a qual se manifesta nestas mesmas regiões encefálicas afetadas, e devido ao fato a ELTM ser o tipo mais comum em adultos e cursar com a refratariedade medicamentosa em 30% dos pacientes (Gorter *et al.*, 2015). Ainda, o método de estimulação elétrica de *kindling* fornece a oportunidade de selecionar quais regiões encefálicas serão estimuladas, entretanto é um método mais demorado e invasivo (Swartz, 2014).

O método químico consiste em repetidas aplicações de agentes convulsivantes, como por exemplo, o pentilenotetrazol (PTZ), picrotoxina, bicuculina e ácido caínico, em dosagens mínimas ou subconvulsivantes, além de ser um método mais rápido e que exclui a necessidade de procedimentos cirúrgicos ou invasivos, como a implantação de eletrodos (Dhir, 2012).

### **1.3.3 Espécies animais para estudo da epileptogênese**

A utilização de modelos animais oferece a possibilidade de uma maior compreensão dos mecanismos fisiopatológicos das doenças que não podem ser acompanhados em humanos. Tradicionalmente, os roedores são os animais mais utilizados para o estudo das epilepsias, porém várias espécies também são utilizadas,

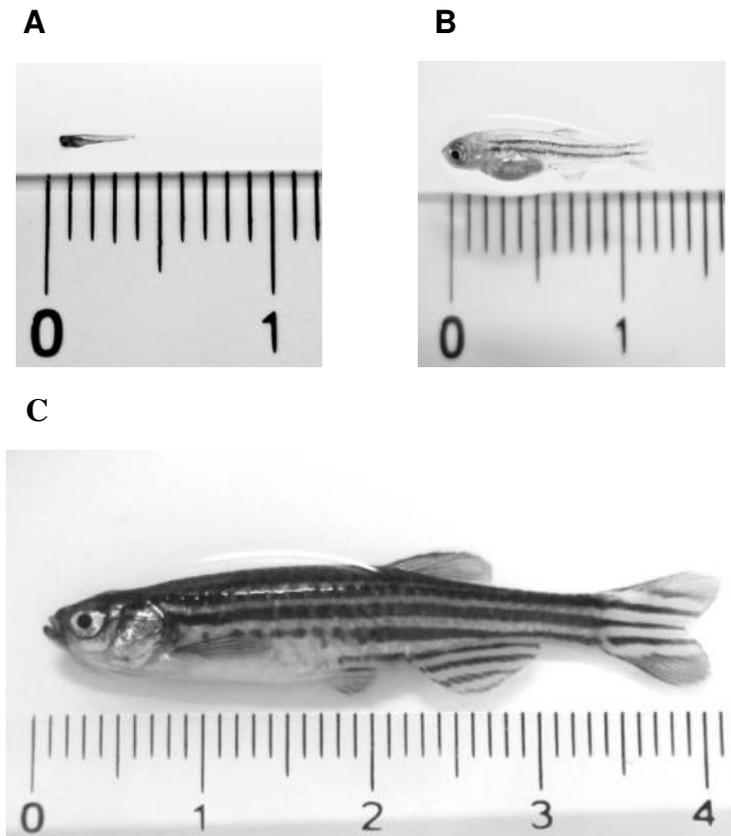
como: coelhos, macacos, gatos, cães, peixes, e até mesmo moscas e minhocas (Shin *et al.*, 2009; Tsuchiya & Kogure, 2011; Xiong *et al.*, 2011; Baraban, 2007).

No que se refere às epilepsias, a importância de um modelo animal é determinada pelo grau em que ele é capaz de reproduzir as alterações observadas durante as condições de crises epiléticas nos seres humanos: alteração no EEG, alterações comportamentais, histológicas e moleculares, sendo uma ferramenta importante na investigação dos mecanismos celulares e moleculares das epilepsias (Baraban, 2007). Além disso, o *screening* de drogas antiepiléticas (DAE) está intimamente ligado à pesquisa translacional em modelos animais (Loscher, 2017).

#### **1.4 O zebrafish**

O *Danio rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish*, peixe-paulistinha ou peixe-zebra, é um pequeno peixe vertebrado teleósteo de água doce, pertencente à família *Cyprinidae*. Originário da Índia, Bangladesh e Nepal, seu habitat natural é caracterizado pelo clima de monções, por regiões alagadiças, de baixa correnteza, e presença de vegetações aquáticas. Estas condições fazem com que haja uma oscilação muito grande na qualidade da água, o que concede a esta espécie mais resistência e tolerância a variações em seu ambiente. É um peixe sociável, portanto vive em cardumes de sexos misturados e mede por volta de 3-4 centímetros, podendo chegar a medir cinco centímetros. Sua morfologia é esguia e alongada com listras longitudinais que percorrem seu corpo e as nadadeiras (figura 3) (Spence *et al.*, 2008).

Figura 3 - Morfologia do *zebrafish*.



Fonte: arquivo LabZeb. Larva com sete dias pós fertilização (A); jovem com um mês de vida (B); adulto com seis meses de vida (C).

Dentre os motivos que levam o *zebrafish* a ser utilizado como modelo animal em experimentação científica, destacam-se o fato de ser um peixe extremamente resistente, que se adapta facilmente a condições adversas em seu ambiente, como alterações de pH, qualidade e temperatura da água, o que faz dele um animal fácil de ser mantido em cativeiro. Seu custo de manutenção é relativamente baixo, quando comparado ao custo de roedores e, devido a sua escala evolutiva muito mais próximo de seres humanos que outros animais invertebrados utilizados para experimentação animal (e.g moscas e nematoides), e por este motivo, apresenta órgãos e estruturas similares morfológica e funcionalmente com humanos (Lieschke & Currie, 2007). Seu desenvolvimento é rápido: o *zebrafish* chega à fase adulta por volta de três meses de idade e possui alta taxa reprodutiva – um casal de *zebrafish* pode fornecer 200 ovos

por semana; somados, estes fatores permitem que várias gerações sejam obtidas em um curto espaço de tempo. O peixe possui desenvolvimento extra-uterino e seus ovos são grandes e totalmente transparentes, permitindo a visualização e monitoramento do desenvolvimento embrionário através do córion, além de manipulações nos primeiros estágios de vida (Fischman, 2001). Além disso, o *zebrafish* possui cerca de 70% de ortologia com o genoma humano, com grandes regiões de sintonia conservadas (Howe *et al.*, 2013).

#### **1.4.1 Tipos celulares do SNC do *zebrafish*: um paralelo com o cérebro humano.**

Recentemente, Raj e colaboradores 2018, realizaram o primeiro catálogo de células progenitoras e maduras no cérebro do *zebrafish* em um estudo no qual foi utilizado uma técnica chamada *scGESTALT* (*Genome editing of synthetic target arrays for lineage tracing + Single-cell RNA sequencing*). Por meio desta técnica, sequenciaram o transcriptoma de aproximadamente 66.000 células do cérebro de *zebrafish* jovem e identificaram 63 populações celulares com expressão gênica distintas. Dentre estas foram encontradas inicialmente 45 subtipos de neurônios, nove classes de progenitores neurais, três classes de oligodendrocitos, células da microglia, células ependimárias, células sanguíneas e células do endotélio vascular (Raj *et al.*, 2018).

Progenitores neurais: cerca de 13% dos *clusters* encontrados (8 grupos) são progenitores neurais, o que confere um crescimento contínuo e favorece a neurogênese no cérebro do *zebrafish*, mesmo na fase adulta. Entre os progenitores, destaca-se as células da glia radial, que são células-tronco neurais do cérebro e expressam *gfap*, *fabp7a* e *s100b*. (Raj *et al.*, 2018).

Endotélio vascular - Perivascular FGP: do termo em inglês “Fluorescent Granular Perithelial Cells”, as FGP’s foram recentemente descobertas no *zebrafish*, e compõem as células do endotélio vascular. São importantes na manutenção da barreira hematoencefálica. (Venero Galanternik *et al.*, 2017)

Células granulares e células de Purkinje: são as células que compõem o córtex cerebelar, que tem como função equilíbrio, gerenciamento de reflexos, coordenação motora e sensorial. As células de Purkinje são eferentes ao cerebelo, apresentam axônios mielinizados e fazem sinapses GABAérgicas (inibitórias). As células granulares fazem sinapses glutamatérgicas (excitatórias). O cerebelo de humanos e teleósteos compartilham das mesmas estruturas básicas. No cérebro do zebrafish, as células de Purkinje começam a se se diferenciar em 67 horas pós-fertilização (hpf), dividindo-se em dois clusters em cada hemisfério do cerebelo: dorsomedial e um ventrolateral, formando uma camada continua em 4 dias pós-fertilização (dpf). Nesta fase, as larvas de *zebrafish* já demonstram capacidade de manter o equilíbrio na água e realizar manobras como fuga de predadores e procura de alimento (Knogler *et al.*, 2017; Hamling *et al.*, 2015).

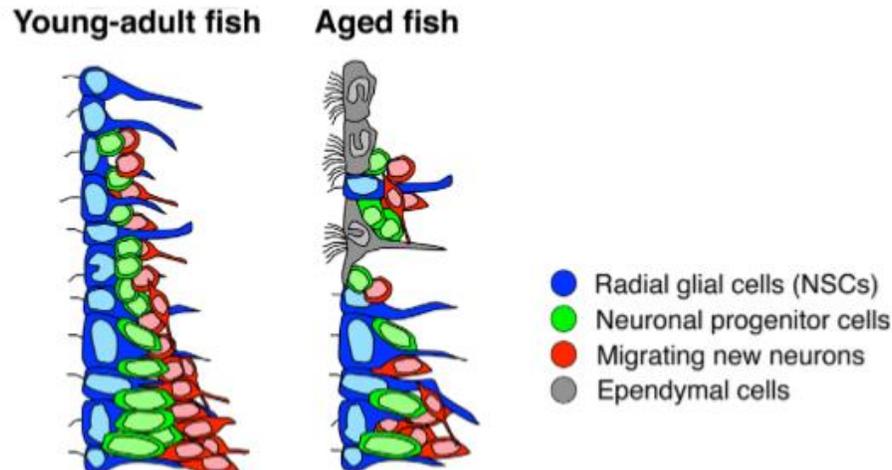
Oligodendrócitos: são células da glia responsáveis pela produção da bainha de mielina no SNC. Os oligodendrocitos envolvem axônios com bainha de mielina e criam pontos desmielinizados chamados nódulos de Ranvier. Esta dinâmica proporciona velocidade às sinapses, conduzindo o impulso nervoso de um nódulo para outro. Há evidências de que a mielina também forneça nutrientes e suporte aos axônios. Mecanismos moleculares, como cascatas sinalizadoras informam os oligodendrocitos a coordenação precisa de mielinização, processo de extrema importância para o sistema nervoso, visto que a desmielinização está ligada a inúmeras doenças, como a esclerose múltipla, por exemplo. O *zebrafish* apresenta semelhança com os oligodendrocitos de mamíferos, com sua composição, estrutura e mecanismos moleculares que orquestram a produção de mielina conservados (Lyons & Talbot, 2014; Preston & Macklin, 2015).

Microglia: as células da microglia compreendem em 5 a 20% das células da glia, e cerca de 10% das células do cérebro humano. São células fagocitárias, que representam a principal defesa do SNC, agindo tanto na resposta imunológica contra patógenos invasores, como na fagocitose de catabólitos resultantes de danos celulares no SNC. São macrófagos altamente especializados e seus precursores são progenitores de monócitos da medula óssea que migram ao SNC durante o desenvolvimento, fagocitando células apoptóticas durante este evento. (Lyons & Talbot, 2014; Sousa *et al.*, 2017).

Células endimárias: são células da glia que compoem o epitélio multiciliado da superfície ventricular do SNC. Tem como função a produção de líquido cefalorraquidiano e neurogênese. Em mamíferos, as paredes ventriculares do cérebro em desenvolvimento mantêm um nicho neurogênico, no qual estão presentes as células glias radiais, que atuam como células-tronco neurais (NSCs) e geram novos neurônios no embrião. No período pós-natal, estas NSCs se diferenciam em células endimárias multiciliadas e astrócitos. No cérebro do *zebrafish*, as células glias radiais podem ser encontradas mesmo na fase adulta, cobrindo a zona ventricular telencefalica, conferindo um alto potencial neurogênico mesmo na fase adulta. (Kyrousi *et al.*, 2017; Del Bigio, 2010). Há evidências de que as células glias radiais se transformam em células endimárias no cérebro do *zebrafish* tardiamente, no estágio de vida senil (Ogino *et al.*, 2016) (Figura 4).

Glia radial/ astrócitos: Um ponto interessante no trabalho de Raj e colegas é que não foram relatados astrócitos no *zebrafish*. Astrócitos são as maiores e mais abundantes células da glia no cérebro humano (Vasile *et al.*, 2017). Suas células progenitoras são as células glias radiais, presentes no SNC durante o desenvolvimento. Possui diversas funções como: manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular; dinâmica de captação e liberação de glutamato, impedindo seu acúmulo no meio extracelular e prevenindo a excitotoxicidade; formação da barreira hematoencefálica; suporte trófico aos neurônios; direcionamento de axônios e formação e funcionamento das sinapses, inferindo na aprendizagem e memória. (Gomes *et al.*, 2013). Uma de suas funções mais importantes e estudadas é sua atuação na resposta à lesões, chamada astrogliose. A reação de astrogliose em resposta a um dano forma as conhecidas cicatrizes glias, que impedem a formação de novas redes neuronais e processos regenerativos no tecido nervoso. O cérebro do *zebrafish* possui células glias radiais não somente na fase de desenvolvimento, mas também durante sua vida adulta, o que favorece a neurogênese continua nesse peixe (Than-Trong & Bally-Cuif, 2015; Lyons & Talbot, 2014). Devido a um perfil transcricional muito semelhante, a glia radial parece exercer o papel dos astrócitos no *zebrafish*, como por exemplo, expressar a proteína GFAP (Raj *et al.*, 2018).

Figura 4 - Mudanças na composição celular do nicho neurogênico relacionadas ao envelhecimento no cérebro adulto do *zebrafish*.



Fonte: Ogino *et al.*, 2016. No cérebro jovem adulto (3-10 meses), células gliais radiais monociliadas (azul) cobrem a parede ventral da zona ventricular telencefálica (VZ), mantendo um alto potencial neurogênico. Estas células gliais radiais geram células progenitoras neurais (verde) e novos neurônios migratórios (vermelho). Na parte dorsal da VZ no *zebrafish* senil (12-24 meses), células gliais radiais se transformam em células ependimárias multiciliadas (cinza). A composição celular da parte ventral da zona ventricular telencefálica do *zebrafish* senil assemelha-se com a zona ventricular subventricular (V-SVZ) do cérebro adulto de camundongo. Tradução e adaptação da autora.

#### 1.4.2 *Zebrafish* como modelo de crises epilépticas

O *zebrafish* foi introduzido como modelo animal para estudos das epilepsias em 2005, num estudo pioneiro realizado por Baraban e colegas, no qual foram descritos e caracterizados os padrões comportamentais, eletroencefalográficos e moleculares em *zebrafish* exposto ao Pentilenotetrazol (PTZ), um agente convulsivante que age como um antagonista do receptor GABAA já muito utilizado em modelos roedores (Baraban *et al.*, 2005).

Os resultados de Baraban e colegas mostraram que o *zebrafish* com 7 dias pós-fertilização (dpf), perante estímulo convulsivante por PTZ, apresenta comportamentos bem definidos que simulam a condição de crise epiléptica em mamíferos, o que é reforçado pelas análises eletroencefalográficas e pela análise molecular – indicando o

aumento da expressão do gene *c-fos*, um marcador de atividade neuronal que tem sua expressão aumentada perante situações de estresse (como crises epiléticas). O comportamento do animal com 7dpf e com crises epiléticas após exposição ao PTZ foi descrito e separado em três fases distintas (Baraban *et al.*, 2005). Estes dados serviram de base para o estudo em animais adultos realizado por Mussulini e colegas em 2013, no qual foram realizadas induções de crise epilética em diferentes concentrações de PTZ no *zebrafish*, conseguindo assim, se obter um padrão mais definido de cada etapa das crises epiléticas que foram divididas em seis fases – 1: aumento da atividade do nado e aumento do movimento opercular; 2: Nado rápido, movimentos para a direita e para a esquerda e movimentos erráticos; 3: movimentos circulares; 4: movimentos que mimetizam crises clônicas (contração muscular); 5: - movimentos que mimetizam crises tônico-clônicas com posterior perda de postura; 6 – morte (Mussulini *et al.*, 2013). O estudo de Mussulini *et al.* foi essencial para a identificação mais minuciosa das fases das crises epiléticas induzidas por PTZ no *zebrafish* adulto.

O *zebrafish* também se apresenta como um excelente modelo genético. Em 2010 foi realizado o primeiro estudo utilizando o *zebrafish* como modelo genético de epilepsia, através da técnica de silenciamento (*knockdown*) do gene *lgi1a*. Mutações no gene *LGI1A* em humanos causam predisposição a um subtipo de epilepsia autossômica dominante. O *knockdown* do gene *lgi1a*, por meio de microinjeção de morfolidos, fez com que o *zebrafish* apresentasse um fenótipo diferenciado, como desenvolvimento anormal e malformações encefálicas, levando a uma predisposição a crises epiléticas, assemelhando-se ao fenótipo encontrado em modelos roedores *knockdown* para o gene *Lgi1a*. (Teng *et al.*, 2010).

Outro uso interessante do *zebrafish* é como modelo *knockout* do gene *aldh7a1* através da técnica de CRISPR-Cas9 para estudo da Epilepsia piridoxina-dependente, uma doença metabólica autossômica recessiva, causada por variantes patogênicas do gene *ALDH7A1* (van Karnebeek *et al.*, 2016). Geralmente esse tipo de epilepsia manifesta-se no período neonatal e é refratária e deve ser controlada por meio da administração de piridoxina por toda a vida. Os animais *knockout* para o gene *aldh7a1* apresentaram um comportamento típico de crises epiléticas, e não responderam a

administração de drogas antiepilépticas, como o fenobarbital e diazepam, ao passo que os animais *wild type* responderam. Porém, apresentaram resposta após a administração de piridoxina. Este estudo caracterizou o *zebrafish* como primeiro modelo animal para estudo da epilepsia piridoxina-dependente (Zabinyakov *et al.*, 2017)

Outros estudos demonstram que o *zebrafish* é um modelo de grande potencial no estudo das epilepsias, como por exemplo, indução de crise epiléptica por hipertermia (Hunt *et al.*, 2013), *screening* de DAE's (Berghmans, 2007), mutagênese em larga escala para identificação de fenótipos resistentes a crises epilépticas (Pichler *et al.*, 2003), entre muitos outros.

Apesar da ampla utilização do *zebrafish* como modelo para estudo das epilepsias e de crises epilépticas, nunca foi relatado a sua utilização como modelo crônico. Devido ao seu potencial para compreensão dos mecanismos celulares e moleculares relacionados às epilepsias, bem como para testes de novas drogas terapêuticos, este estudo, do tipo exploratório, visa verificar se o *zebrafish* tem a capacidade de se tornar cronicamente epiléptico após tratamento com doses subconvulsivantes de PTZ.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo principal

Investigar se o *zebrafish* pode se tornar cronicamente epiléptico por meio da técnica de *kindling* químico.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Induzir o *zebrafish* adulto aos estímulos subconvulsivantes de PTZ na concentração de 7,5mM por 2 minutos durante um período de 60 dias;
2. Investigar o padrão comportamental e da expressão de genes possivelmente associados com epileptogênese em *zebrafish* expostos a estímulos subconvulsivantes através da administração de PTZ.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Comitê de Ética**

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP, protocolo 4037-1 (anexo).

#### **3.2 Aquisição, manutenção e cuidados dos animais.**

Os *zebrafish wild type* foram disponibilizados pelo Laboratório/Biotério *Zebrafish*, localizado no Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP.

Os peixes adultos foram mantidos em uma sala climatizada a 23°C, com controle de fotoperíodo, sendo 14 horas de ciclo claro e 10 horas de ciclo escuro. Os animais ficaram em aquários de 30 e 20 litros com densidade de 2-3 peixes/litro em água com pH 7,0 e temperatura mantida 25°C ± 1°C (Westerfield, 2000). A limpeza dos aquários e controle dos parâmetros indicadores de qualidade da água, tais como: pH, amônia, nitrito e nitrato foram realizados semanalmente. A alimentação obedeceu ao seguinte padrão: ração flocada TetraMin® 3 vezes ao dia, com suplementação proteica fornecida pelo oferecimento de artêmia.

#### **3.3 Definição da curva dose-resposta e indução de crise epiléptica através da administração de Pentilenotetrazol (PTZ)**

Foram utilizados 20 animais para grupo controle (GC), e 20 foram utilizados para grupo teste (PTZ 7,5 mM). No total, utilizamos 47 devido a possibilidade de morte dos animais durante o experimento.

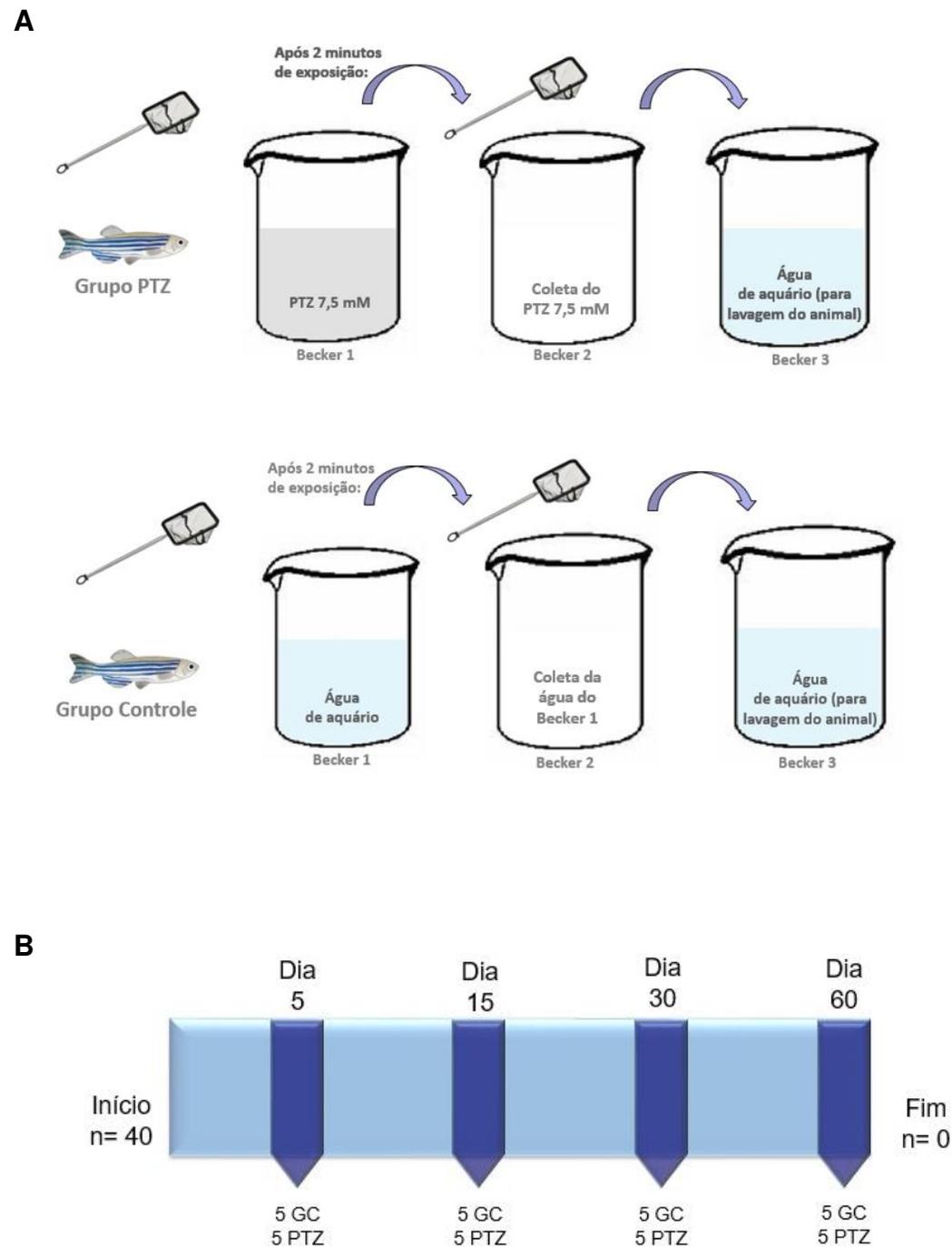
A escolha da concentração foi realizada após teste curva dose-resposta de PTZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em nosso laboratório. Como se trata de um estudo que nunca antes havia sido realizado, utilizamos como referência protocolos de indução

de crise epiléptica aguda no *zebrafish* (Baraban, 2005; Mussulini 2013) e a partir daí, realizamos os testes, nas seguintes concentrações: 10mM, 7,5mM, 5mM, 3mM, 2,5mM e 1,5 mM (dados não publicados). Importante ressaltar que a exposição ao PTZ é tempo-dependente, ou seja, mesmo em baixas concentrações, se o animal permanecer exposto ao agente por muito tempo irá apresentar crise epiléptica em algum momento. O tempo médio em que um animal adulto leva para atingir uma crise epiléptica completa por meio da indução pelo PTZ na dosagem de 15mM é de 2 a 3 minutos. Consideramos crise epiléptica completa quando o animal perdia a postura. Sendo assim, escolhemos a dosagem de 7,5mM com um tempo de exposição de 2 minutos, ou seja, metade da dose utilizada para indução de crises agudas, em uma média de tempo em que os animais levam para apresentar crise epiléptica completa. A intenção da escolha dose/tempo é não deixar que o estímulo seja feito de forma aguda.

As induções foram realizadas de segunda a sexta, durante um período de 60 dias, sempre com início no horário das 9hrs da manhã. Ao decorrer do período de 60 dias, parte dos animais foi separada para estudos visando a observação da evolução do estímulo de *kindling*, sendo estes realizados no 05º dia, 15º dia, 30º dia e no 60º dia, totalizando quatro períodos de análise. Para cada período foi utilizado um n=10: cinco animais do grupo controle e cinco do grupo teste. Com uma rede, os animais do grupo teste (PTZ 7,5mM) foram transferidos individualmente dos aquários para um becker de 200ml contendo solução de PTZ 7,5mM diluído diretamente em água de aquário por um período de dois minutos. Os animais do grupo controle (GC) foram expostos ao mesmo estímulo, porém em Becker com água de aquário livre de PTZ.

Após o período de exposição, os animais foram transferidos para um Becker de 200ml com água limpa para lavagem (figura 5).

Figura 5 - Ilustração representativa do protocolo experimental.



Manipulação dos animais no grupo controle (GC) e teste (PTZ 7,5mM) (A); setas em azul escuro representam os períodos escolhidos para sacrifício dos animais e posterior análise molecular, no decorrer dos 60 dias de experimento (B). Observar diminuição da população (início n =40, fim n =0)

### 3.4 Análise comportamental e extração dos cérebros

A análise comportamental foi realizada durante a indução de crise epilética por meio de visualização direta das fases de crise epilética conforme descrita por Mussolini et al, 2013.

Tabela 1: Fases do padrão comportamental durante crise epilética em *zebrafish* adulto:

Fase	Comportamento
1	Aumento da atividade do nado e aumento do movimento opercular
2	Nado rápido, movimentos para a direita e para a esquerda e movimentos erráticos
3	Movimentos circulares
4	Movimentos estereotipados que mimetizam crises clônicas (contração muscular)
5	Movimentos estereotipados que mimetizam crises tônico-clônicas com posterior perda de postura.
6	Morte
Fonte: Mussolini <i>et al.</i> , 2013	

Nos tempos determinados (dias 05, 15, 30 e 60) os animais foram anestesiados em solução de gelo com água na proporção de quatro para um até que se observasse a paralização de seus movimentos, sendo em seguida decapitados para a coleta dos cérebros, que foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em um freezer a -80°C até sua utilização.

### 3.5 Análise molecular

A análise molecular foi realizada por meio da quantificação dos transcritos dos genes: *c-fos* (ZDB-GENE-031222-4), gene de expressão imediata (IEG) usado como marcador de atividade neuronal (Morgan, 1987); *fos-b* (ZDB-GENE-041114-181) relacionado a plasticidade neuronal em resposta a estímulos de longa duração (Hope, 1994); *kalirin* (ZDB-GENE-100921-4) relacionado a plasticidade sináptica (Ma, 2003); *cox-2b* (ZDB-GENE-041014-323) e *il1 $\beta$*  (ZDB-GENE-040702-2), genes relacionados a neuroinflamação (Kauffman, 2008; Rojas, 2014). Os dados dos genes descritos podem ser acessados na plataforma Ensembl ([http://www.ensembl.org/Danio\\_rerio](http://www.ensembl.org/Danio_rerio)). Foram utilizadas técnicas de extração de RNA, RT-PCR (transcriptase reversa) e PCR quantitativa em equipamento de PCR em tempo Real, como descrito a seguir:

#### 3.5.1 Extração de RNA Total

Foi realizada extração do RNA total do cérebro dos animais pelo método TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo passo a passo o protocolo descrito resumidamente: O tecido foi macerado e homogeneizado em trizol na proporção de 1ml para cada 100mg de tecido em um microtubo de 1,5ml e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos; em seguida, após a adição do clorofórmio, foi incubado a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugado a 4<sup>o</sup> C a 12.000 RCF por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e então foi adicionado álcool isopropílico, incubado a temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 RCF em temperatura 4o C por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e adicionado etanol 75% e o material centrifugado a 7.600 RCF em temperatura 4o C por 10 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscendido em água milliQ. Após a extração, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria em equipamento Epoch (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA).

### 3.5.2 Eletroforese em gel de agarose para análise da qualidade do RNA

Após a extração do RNA total, a fim de se verificar a qualidade e integridade do material obtido foi realizada eletroforese das amostras em gel de agarose 2% corado com SyberSafe.

### 3.5.3 RT- PCR (Transcriptase Reversa)

A síntese do cDNA a partir do RNA total foi realizada utilizando-se o *kit High Capacity Applied Biosystem*, Foster City, CA, EUA). O protocolo da reação está descrito resumidamente a seguir: 2 µl de Buffer (10x); 0,8 µl de dNTP mix (25x, 100 mM); 1 µl da Multiscribe transcriptase reversa; 1 µg de RNA em volume final de 20 µl completado com água milliQ. As condições de termociclagem foram 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85° C por 5 segundos.

### 3.5.4 PCR em Tempo Real

As reações de PCR quantitativa em tempo real foram realizadas pelo sistema TaqMan™ (Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Os *primers (assays)* foram desenhados com uma sonda marcada com o fluoróforo FAM para o gene de referência *ef1α* e, para os genes alvo *c-fos*, *cox2*, *fos-b*, *klrn* e *il1β*.

Para a quantificação relativa dos genes de interesse, as reações de PCR quantitativa em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625 µL da solução de *primers* e sonda, 1,625 µL de água e 4,0 µL de cDNA (7,5ng/µL), sendo que no controle negativo, adiciona-se 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos através de análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA).

### **3.6 Análise estatística**

A análise estatística para a verificação da diferença na expressão dos genes candidatos entre grupos controle e experimental em cada período de estímulo foi realizada pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney. O perfil temporal entre os períodos de análise foi realizada pelo teste ANOVA, duas vias. As diferenças foram consideradas significativas quando obtido um  $p \leq 0,05$ . As análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism® (Versão 7.03).

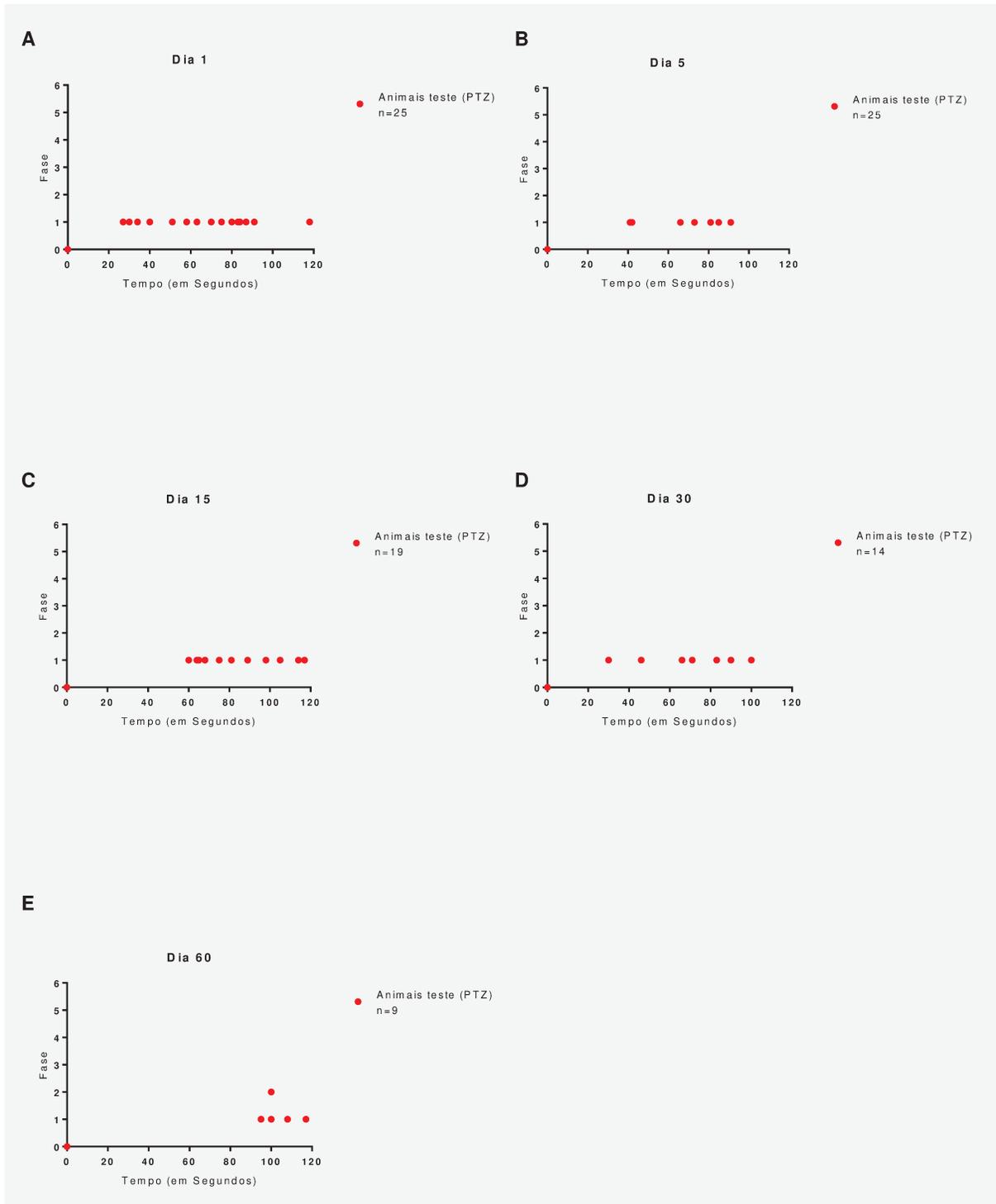
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Comportamento

O experimento foi realizado sempre de forma pareada (controle e teste). A análise comportamental foi realizada por meio de observação visual, relacionando o comportamento observado ao modelo de padrão comportamental durante crise epiléptica, como estabelecido por Mussulini et al. (ver tabela 1). Também foi anotado o tempo em que o animal levou para apresentar a alteração no comportamento, a qual é observada pela atividade do nado. Caracterizamos como crise epiléptica completa quando o animal atinge a fase 5 (movimentos tônico-clônicos com posterior perda de postura). A perda de postura no *zebrafish* pode ser observada quando o animal cai ao fundo do aquário, perdendo a postura de nado e o controle sobre seus movimentos.

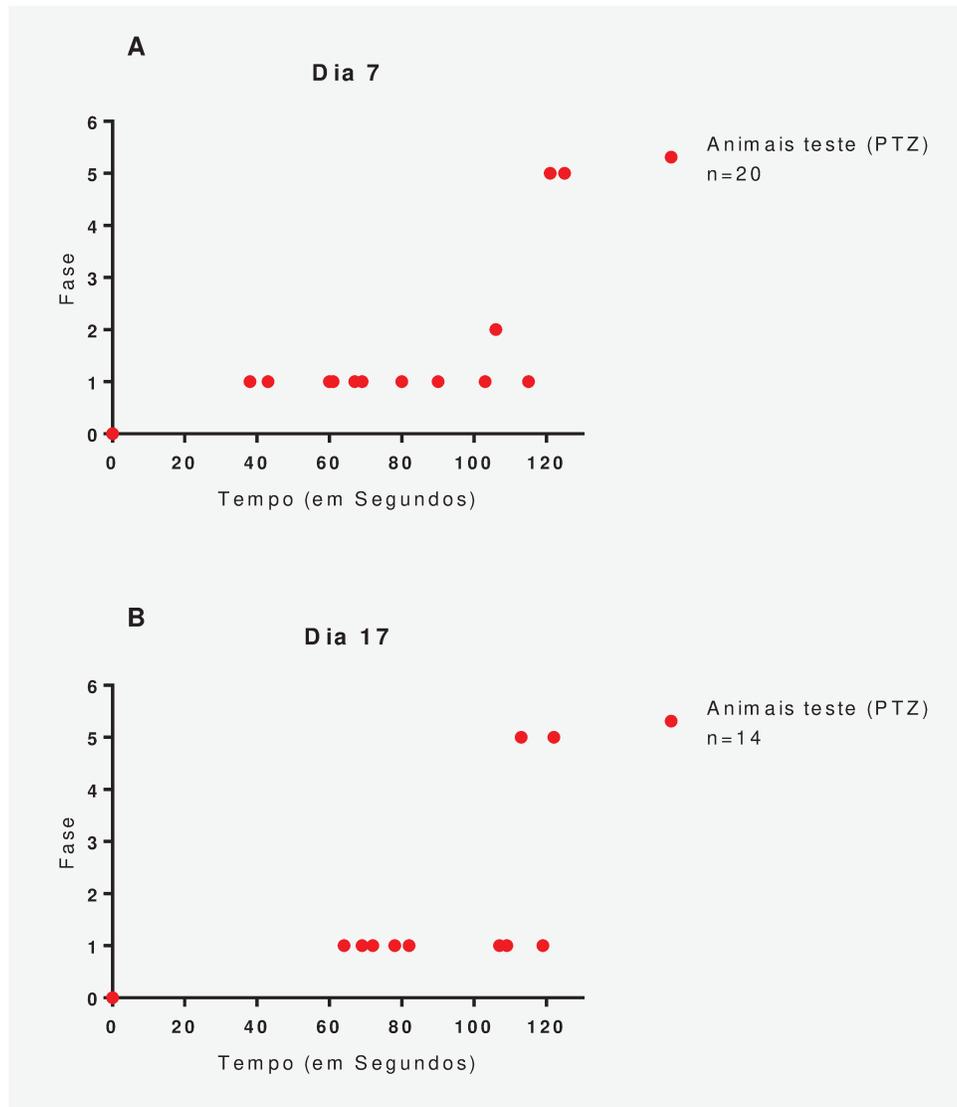
Durante todo o experimento, os animais, em sua maioria apresentaram apenas uma agitação, como caracterizado na fase 1 e, eventualmente, alguns na fase 2. Porém, é importante pontuar que durante o período de tratamento, especificamente no 7º dia, dois animais atingiram a fase 5, após os dois minutos de exposição e durante a retirada do agente PTZ e passagem para o Becker com água de aquário. Outros dois animais apresentaram a fase 5 no 17º dia do experimento: um atingiu a fase 5 após os dois minutos de exposição, e outro atingiu a fase cinco aos 117", ou seja, durante a exposição. Como não houve individualização dos animais, não foi possível identificar quais foram os animais que apresentaram este comportamento, ou se os eventos ocorreram com os mesmos animais. Como esperado, o grupo controle não apresentou nenhuma alteração de comportamento. A Figura 6 exemplifica o comportamento nos mesmos tempos selecionados para análise molecular. Figura 7 mostra os animais que apresentaram crise epiléptica com perda de postura.

Figura 6 - Representação do tempo (em segundos) em que os animais do grupo teste expostos a dose subconvulsivante de Pentilenotetrazol (PTZ) 7,5mM, levaram para alcançar uma das fases de crise epiléptica, descritas em Mussulini et al, 2013.



Primeiro dia de experimento, n=25 (A); 5º dia de experimento, n=25 (B); 15º dia de experimento, n=19 (C); 30º dia de experimento, n=14 (D); 60º dia de experimento, n=9 (E).

Figura 7 - Representação dos animais que alcançaram a fase 5 (movimentos tônico-clônicos com posterior perda de postura) segundo Mussulini et al, 2013



No 7º dia de experimento, n=20 (A); No 17º dia de experimento, n=14 (B).

Analisando a evolução do experimento é possível observar que os animais apresentaram um padrão comportamental que se mostrou semelhante entre todos, sofrendo poucas alterações no decorrer do experimento. Podemos notar que a maioria dos animais ficam entre a fase 1 e 2, apresentando diferença apenas no tempo em que levam para apresentar tais comportamentos. No segundo dia de experimento, um animal do grupo controle foi encontrado morto no aquário.

## 4.2 Expressão gênica

Houve aumento significativo dos níveis de RNA mensageiro do gene *cfos* no grupo PTZ 7,5mM em comparação ao GC no 5o dia de experimento. Este aumento voltou a ocorrer aos 60 dias de exposição (ver figura 8). Para a observação do padrão de expressão no decorrer da exposição foi realizado um teste paramétrico ANOVA com *Bonferroni* como teste *post-hoc*. Por meio desta análise foi possível observar que o gene estava hiperexpresso logo no início da estimulação subconvulsivante, no dia 5, sendo significativamente menos expresso no 15º dia, voltando a aumentar gradativamente nos dias 30 e 60 de exposição (ver figura 9). O RNAm *klrn* mostrou-se menos expresso que o grupo controle no 15º dia de experimento (ver figura 13). A quantificação relativa para os genes *cox2*, *il1β* e *fosb* não apresentou diferença estatística significativa.

A média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5$ ) obtidos para cada gene estão dispostos nas tabelas abaixo:

<b><i>cfos</i></b>	<b>Média <math>\pm</math> SEM - GC</b>	<b>Média <math>\pm</math> SEM - PTZ</b>	<b>Significância (<math>p \leq 0,05</math>)</b>
Dia 5	1,01 $\pm$ 0,07	3,20 $\pm$ 0,79	<b>p= 0,0040</b>
Dia15	1,37 $\pm$ 0,61	0,74 $\pm$ 0,13	p=0,3452
Dia 30	1,07 $\pm$ 0,22	0,88 $\pm$ 0,09	p= 0,5000
Dia 60	1,02 $\pm$ 0,10	1,9 $\pm$ 0,25	<b>p=0,0079</b>

Tabela 2 - Quantificação relativa do mRNA do gene *cfos* – Grupos Controle e PTZ 7,5mM, nos dias: 5, 15, 30 e 60.

<b><i>cox2</i></b>	<b>Média <math>\pm</math> SEM - GC</b>	<b>Média <math>\pm</math> SEM - PTZ</b>	<b>Significância (<math>p \leq 0,05</math>)</b>
Dia 5	1,12 $\pm$ 0,24	1,60 $\pm$ 0,32	p=0,1111
Dia15	1,01 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,15	p=0,2103
Dia 30	1,00 $\pm$ 0,04	1,12 $\pm$ 0,10	p=0,2103
Dia 60	1,05 $\pm$ 0,18	0,79 $\pm$ 0,07	p=0,1111

Tabela 3: Quantificação relativa do mRNA do gene *cox2* – Grupos Controle e PTZ 7,5mM, nos dias: 5, 15, 30 e 60.

<i>fosb</i>	Média ± SEM - GC	Média ± SEM- PTZ	Significância (p≤0,05)
Dia 5	1,02 ± 0,11	1,14 ± 0,24	p= 0,5000
Dia15	0,74 ± 0,10	0,58 ± 0,09	p= 0,1548
Dia 30	1,06 ± 0,21	0,71 ± 0,09	p=0,1111
Dia 60	1,03 ± 0,13	1,09 ± 0,29	p=0,4206

Tabela 4: Quantificação relativa do mRNA do gene *fosb* – Grupos Controle e PTZ 7,5mM, nos dias: 5, 15, 30 e 60.

<i>il1b</i>	Média ± SEM - GC	Média ± SEM - PTZ	Significância (p≤0,05)
Dia 5	1,02 ± 0,11	1,14 ± 0,24	p= 0,5000
Dia15	0,74 ± 0,10	0,58 ± 0,09	p= 0,1548
Dia 30	1,06 ± 0,21	0,71 ± 0,09	p=0,1111
Dia 60	1,03 ± 0,13	1,09 ± 0,29	p=0,4206

Tabela 5: Quantificação relativa do mRNA do gene *il1b* – Grupos Controle e PTZ 7,5mM, nos dias: 5, 15, 30 e 60.

<i>kalirin</i>	Média ± SEM - GC	Média ± SEM - PTZ	Significância (p≤0,05)
Dia 5	1,01 ± 0,07	0,89 ± 0,07	p=0,2103
Dia15	1,38 ± 0,37	0,81 ± 0,07	<b>p=0,0159</b>
Dia 30	1,00 ± 0,06	0,86 ± 0,13	p=0,3452
Dia 60	0,69 ± 0,24	1,23 ± 0,07	p=0,1111

Tabela 6: Quantificação relativa do mRNA do gene *kalirin* – Grupos Controle e PTZ 7,5mM, nos dias: 5, 15, 30 e 60.

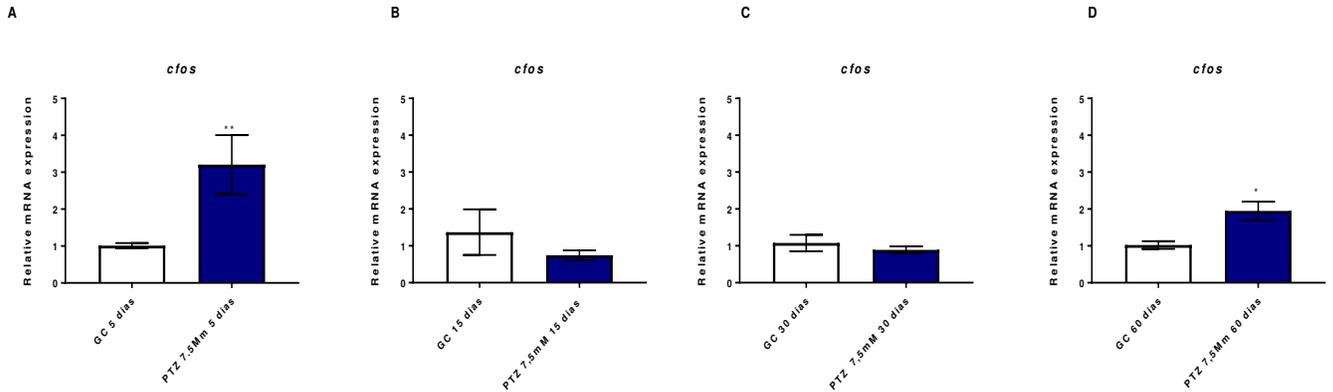


Figura 8: Gráficos representando a quantificação relativa de RNA mensageiro do gene *cfos*, comparando grupo controle (GC) e teste (PTZ 7,5mM). (A) dia 5 (B) dia 15 (C) dia 30 (D) dia 60. As barras representam o erro padrão da média ( $p \leq 0,05$ ). \*\*  $p \leq 0,01$  e \* $p \leq 0,05$

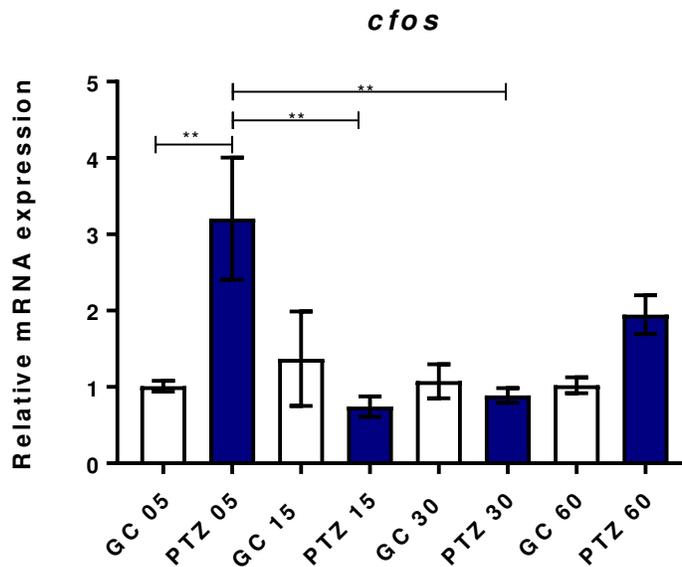


Figura 9: Análise temporal do transcrito do gene *cfos* entre os grupos 05, 15, 30 e 60 dias. CNT 05 x PTZ 05  $p = 0,0097$ ; PTZ 05 X PTZ 15  $p = 0,0025$  PTZ 05 X PTZ 30  $p = 0,0053$ .

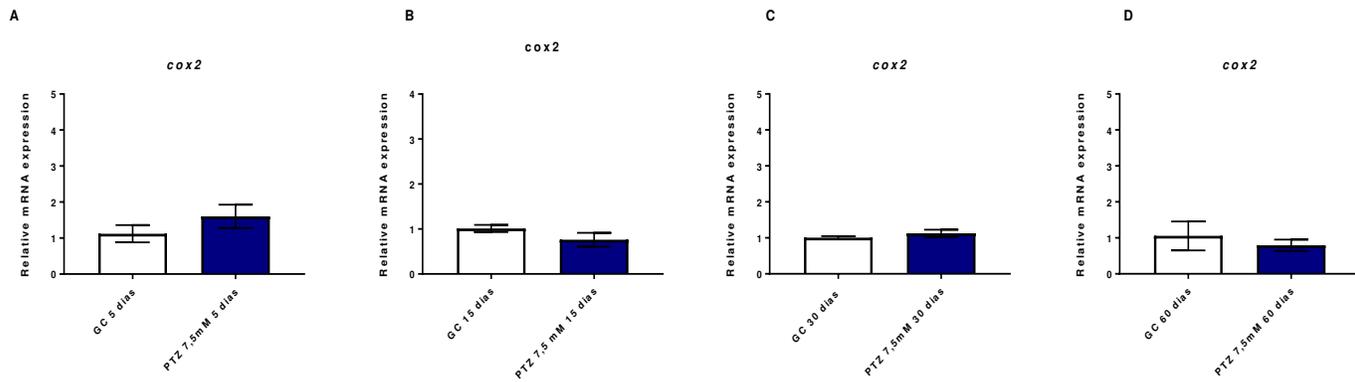


Figura 10: Gráficos representando a quantificação relativa de RNA mensageiro do gene *cox2*, comparando grupo controle (GC) e teste (PTZ 7,5mM). (A) dia 5 (B) dia 15 (C) dia 30 (D) dia 60. As barras representam o erro padrão da média ( $p < 0,05$ )

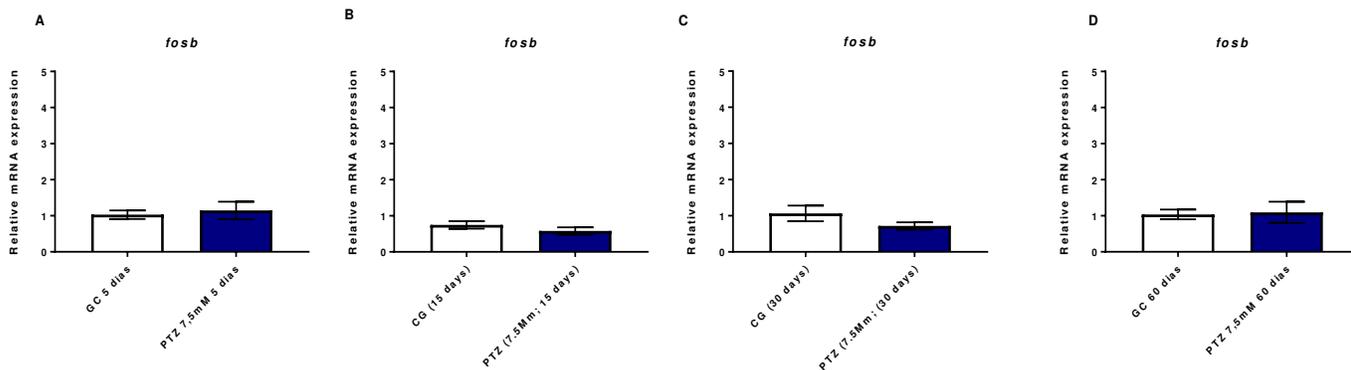


Figura 11: Gráficos representando a quantificação relativa de RNA mensageiro do gene *fosb*, comparando grupo controle (GC) e teste (PTZ 7,5mM). (A) dia 5 (B) dia 15 (C) dia 30 (D) dia 60. As barras representam o erro padrão da média ( $p \leq 0,05$ )

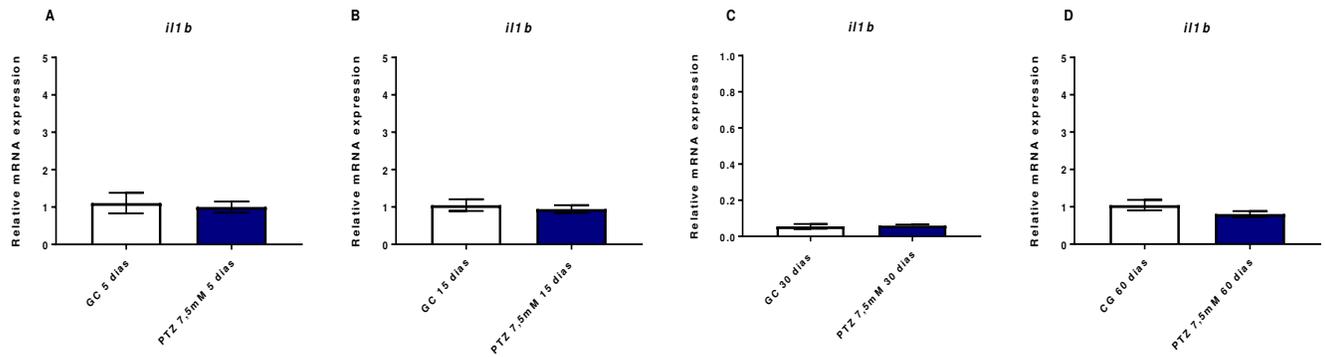


Figura 12: Gráficos representando a quantificação relativa de RNA mensageiro do gene *il1 $\beta$* , comparando grupo controle (GC) e teste (PTZ 7,5mM). (A) dia 5 (B) dia 15 (C) dia 30 (D) dia 60. As barras representam o erro padrão da média ( $p \leq 0,05$ )

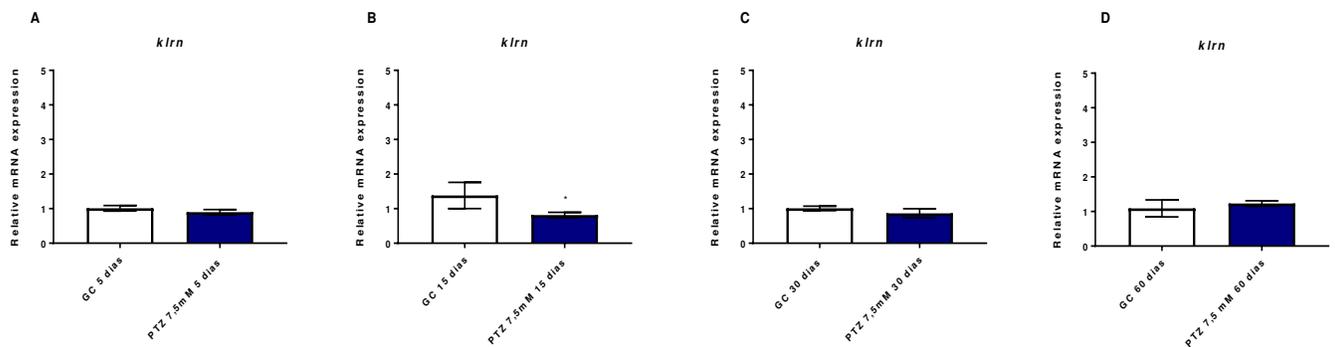


Figura 13: Gráficos representando a quantificação relativa de RNA mensageiro do gene *kalirin*, comparando grupo controle (GC) e teste (PTZ 7,5mM). (A) dia 5 (B) dia 15 (C) dia 30 (D) dia 60. As barras representam o erro padrão da média ( $p \leq 0,05$ ). \* $p \leq 0,05$

## 5. DISCUSSÃO

Como já apresentado, a epileptogênese é o mecanismo de maior relevância no estudo das epilepsias, por ser um processo capaz de tornar um cérebro saudável em susceptível a crises epiléticas espontâneas (Pitkanen *et al.*, 2015). Esse é um mecanismo complexo, que envolve alterações moleculares e celulares, portanto, a investigação de biomarcadores da epileptogênese em modelos animais tem sido um método muito utilizado na comunidade científica (Pitkanen & Lakasiuk, 2011). Por este motivo, para esse estudo, foram escolhidos genes que têm sua expressão alterada na epilepsia. O gene *CFOS* é um proto-oncogene da família *Fos*. Desde que foi descoberto seu papel na atividade dos circuitos neuronais no sistema nervoso central durante crises epiléticas (Morgan *et al.*, 1987) é o mais utilizado biomarcador de atividade neuronal, pois é expresso em níveis basais no cérebro em condições normais, e hiperexpresso em resposta a estímulos, como a crise epilética (Herrera & Robertson, 1996). É um *immediate early gene* – IEG: gene que apresenta aumento de expressão imediatamente após exposição ao estímulo, sendo este efeito passageiro, voltando aos níveis basais rapidamente (Kiesling & Gass, 1993). Seu papel nas epilepsias já é bem estabelecido, inclusive no modelo *zebrafish*, o qual já foi demonstrado que tem um aumento da expressão do *mRNA c-fos* após indução de crise epilética por PTZ (Baraban *et al.*, 2005; Barbalho *et al.*, 2016). Portanto, acompanhar o padrão de expressão desse gene no cérebro do *zebrafish*, pode indicar se está havendo maior recrutamento de neurônios pelo tratamento com o PTZ. Nossos resultados mostraram que há um aumento significativo em relação ao grupo controle no início do tratamento e no final (figuras 9 e 10). Interessante notar que houve uma diminuição no 15º dia de tratamento em relação ao grupo controle, que embora não tenha significância estatística, chama a atenção. O fato de haver um aumento que chega a ser significativo no 60º dia de tratamento pode indicar que o cérebro do *zebrafish* volta a ter uma maior responsividade ao tratamento. No entanto, somente a continuidade do tratamento poderia confirmar essa hipótese.

O gene *FOSB* é também um proto-oncogene da família *Fos*, porém apresenta um padrão de expressão diferente do *CFOS*: sua expressão é mais lenta em resposta a um estímulo contínuo, sendo que a mesma pode perdurar por um período maior (Hope *et*

*al.*, 1994). Devido a esta característica, o *fosb* pode indicar modificações por estímulos de efeito crônico, como tratamento com fármacos antidepressivos, administração contínua de drogas de abuso e indução de crises epiléticas crônicas, pois o aumento da transcrição de suas proteínas indica uma modificação e plasticidade do cérebro em resposta ao stress (Nestler *et al.*, 1999; Madsen *et al.*, 2010).

A Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e COX2 são importantes mediadores do processo inflamatório. A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória, enquanto a COX2 é uma enzima que catalisa ácido aracdônico em prostaglandinas, importante sinalizadores no processo inflamatório (Kauffman *et al.*, 2008). Seus genes codificantes – *COX2* E *IL1 $\beta$*  são importantes biomarcadores de inflamação, e muitos estudos sugerem que podem exercer um importante papel na epileptogênese, além de serem superexpressos após a indução de crises epiléticas (Rojas *et al.*, 2014; Barbalho *et al.*, 2016). Um interessante indício dessa função é de que o tratamento com indometacina, fármaco de ação anti-inflamatória, diminui a expressão do RNA mensageiro da *cox2* e *il1 $\beta$*  em *zebrafish* exposto a crise epilética por PTZ (Barbalho *et al.*, 2016). Em nossos resultados, não houve alteração na expressão dos genes *cox2* e *il1 $\beta$*  em nenhum dos períodos analisados. Isto pode ser um indício de que o tratamento aplicado não foi capaz de gerar processo inflamatório.

O *KALIRIN* é um gene codificador de proteínas da família Rho GEF quinase (*guanine nucleotide exchange fator* - GEF) ou seja, tem como função catalizar GTP (guanina trifosfato) em GDP (guanina difosfato), ativando uma cascata de reações que regulam diversos processos celulares, sendo os principais, a remodelação do citoesqueleto de actina, inferindo em um rearranjo de estruturas dendríticas, e exercendo um importante papel na manutenção de sinapses (Ma *et al.*, 2003). Apresenta um complexo padrão de expressão durante o desenvolvimento cerebral (McPherson *et al.*, 2004) e está presente em abundância no hipocampo - área do cérebro relacionada a memória - onde exerce um papel fundamental na função das sinapses excitatórias, ao participar do processo de potenciação de longa duração – LTP (*Long Term-Potentiation*), processo envolvido na plasticidade sináptica (Herring, 2016). O *Kalirin* é um gene que possui *splicing* alternativos, portanto é expresso em diversas isoformas, exercendo diferentes papéis (Mandela & Ma, 2012). Por ser um gene

multifuncional, alterações genéticas que levam a sua disfunção estão relacionadas a diversos tipos de doenças, tais como doença de Huntington (Puigdemívol *et al.*, 2015), doença arterial coronariana (Wang *et al.*, 2007), e doenças neuropsiquiátricas como Alzheimer e Esquizofrenia (Remmers & Sweet, 2014). Muitos estudos o associam a plasticidade neuronal, visto que, quando hiperexpresso, pode ser observado um aumento de densidade e ramificação dendrítica (Penzes & Remmers, 2008). De modo contrário, observa-se que ratos *knockout* para a isoforma *Kalirin-7* (isoforma mais abundante do *kalirin* no cérebro) apresentaram cerca de 15% de redução da densidade dendrítica e déficit no LTP (Mandela & Ma, 2012; Ma *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2015). Apesar de não ser comumente associado ao estudo das epilepsias, já foi relatado aumento relevante da expressão do *Kalirin* na região do hipocampo em modelo animal (rato) de Epilepsia do Lobo Temporal Mesial, em resposta a indução de crise epiléptica por ácido caínico (Sharma *et al.*, 2009). Devido ao seu importante papel na manutenção sináptica e arborização dendrítica, sendo um marcador de plasticidade neuronal e, por ser pouco explorado o seu possível impacto na fisiopatologia das epilepsias foi um dos genes candidatos nesta investigação molecular. Nossos resultados evidenciam que o gene *kalirin* diminuiu significativamente no 15º dia de tratamento. O exato significado desse achado ainda merece maiores investigações, mas esse resultado acompanha a diminuição que ocorre no gene *c-fos* nessa mesma data (Figura 9) e poderia ser uma tentativa de proteção ao estímulo químico, mesmo em dose subconvulsivante. No entanto, o transcrito permanece sem alteração, quando o gene *c-fos* volta a aumentar depois de 60 dias (Figura 9).

Nossos resultados indicam que, a princípio, por este protocolo de *kindling* químico com PTZ, o *zebrafish* não se torna cronicamente epiléptico. No entanto, durante esse período de tratamento houve alterações moleculares, indicando que o cérebro começou a demonstrar uma resposta aos estímulos, em especial quando comparamos a atividade neuronal por meio da análise do gene *c-fos* no 60º dia (Figura 9). Em relação à plasticidade, houve uma diferença significativa aos 15 dias de tratamento, para o gene *kalirin*. Essa alteração foi pontual para essa data, o que pode ser indicativo de uma menor resposta ao tratamento nesse período, no entanto seriam necessários outros estudos para confirmar essa observação e investigar as razões.

Apesar dos outros genes não apresentarem diferença significativa nessa data de 15 dias, todos apresentaram uma tendência de diminuição nesse período (figuras 9, 11, 12, 13 e 14).

É importante investigar a capacidade do *zebrafish* em se mostrar cronicamente epilético, pois há diversos estudos demonstrando que o *zebrafish* é capaz de mimetizar crises epiléticas provocadas, porém não há estudos relatando sua capacidade em ficar cronicamente epilético.

Nosso protocolo teve um período de estimulação subconvulsivante de 60 dias, no entanto, não se sabe quais alterações moleculares ou comportamentais poderiam ocorrer após esse período, ou até mesmo, se a continuidade do tratamento levaria o *zebrafish* a desenvolver epilepsia, ou seja, desenvolver a capacidade de apresentar crises epiléticas espontâneas.

É interessante ressaltar que, diferente do SNC de mamíferos, que possui limitada neurogênese, o SNC do *zebrafish* possui uma grande capacidade de neuroregeneração e neurogênese, mesmo na fase adulta (Duy *et al.*, 2017; Ghosh & Hui, 2016). Como apresentado anteriormente, o *zebrafish* possui uma grande quantidade de células progenitoras no cérebro adulto (Raj *et al.*, 2018). Entre elas, a glia radial se destaca por ser, aparentemente, a maior fonte de progenitores neurais, sendo relacionada a neurogênese/neuroregeneração e a possível chave da resistência a lesões no cérebro do *zebrafish* (Ghosh & Hui, 2016). As células gliais radiais são progenitoras neurais presentes tanto no cérebro de mamíferos como do *zebrafish*, durante o desenvolvimento. Em mamíferos, após o período neonatal estas células se diferenciam em células endimárias e astrócitos. Os astrócitos agem na resposta a lesões no SNC, sofrendo mudanças morfológicas, tornando-se densos e hipertróficos, e formando as chamadas cicatrizes gliais, que são uma forma de proteção aos neurônios ilesos, porém impedem a regeneração e formação de novos neurônios (Cregg *et al.*, 2014). O *zebrafish* não possui astrócitos, porém há indícios de que algumas células gliais radiais exercem este papel, devido ao seu perfil transcricional, expressando genes como: *gfap*, *fabp7a* e *s100b* (Raj *et al.*, 2018). A glia radial no *zebrafish* funciona como células troncos neurais que podem se diferenciar e dar origem a diversos tipos de neurônios, mesmo na fase adulta (Lyons & Talbot, 2014). Isso confere uma maior resistência ao

peixe, fazendo com que ele não forme as cicatrizes gliais como observado no cérebro mamífero. No entanto, investigações histológicas em *zebrafish* adulto após exposição a PTZ demonstraram que, mesmo com a característica de não formar cicatriz glial, o *zebrafish* apresenta gliose reativa, expressando a proteína GFAP em áreas do cérebro como a zona ventricular, sendo possível observar também a proliferação de novos neurônios (Duy, 2017). Isto demonstra que, assim como mamíferos, o *zebrafish* apresenta a mesma sinergia de reações neurológicas, porém sua capacidade regenerativa, neurogênica e de plasticidade neuronal é muito superior (Duy, 2017). Estas características podem indicar uma resistência do *zebrafish* em ficar cronicamente epilético. Sua capacidade regenerativa desperta o interesse da comunidade científica, pois diversos estudos investigaram genes possivelmente envolvidos na neurogênese e neuroregeneração e quais suas funções/impacto no *zebrafish* (Kizil, 2013 *et al.*; Kizil *et al.*, 2012). Além disso, especula-se possíveis estratégias de terapias futuras em vertebrados mais complexos (Ghosh & Hui, 2016).

O grupo de pesquisa do Laboratório *Zebrafish* já realiza estudos que se baseiam na proposta deste trabalho: induzir o *zebrafish* a estímulos subconvulsivantes, nas fases de desenvolvimento e senilidade, afim de comparar as reações comportamentais, elétricas e moleculares nos diferentes estágios de vida, e assim buscar mais respostas para melhor compreender a resistência deste animal.

Devido às vantagens do modelo *zebrafish* é importante que se investigue sua capacidade como modelo crônico de epilepsia, com protocolos diferentes, assim como ocorre em modelos de roedores, que utilizam diferentes agentes indutores químicos e até mesmo elétricos (Gorter *et al.*, 2015; Swartz, 2014). Protocolos que possam levar o cérebro desse pequeno peixe a se tornar cronicamente epilético podem agregar novas oportunidades de estudos e conhecimentos, visto as vantagens que o *zebrafish* oferece para investigações de imagem, genéticas e de *screening* de drogas.

Por outro lado, e mais importante, caso o *zebrafish* não se torne cronicamente epilético por conta de sua capacidade regenerativa, torna-se um modelo instigante para estudo das epilepsias e pode contribuir para a descoberta de novos caminhos para o tratamento das epilepsias em humanos.

## 6. CONCLUSÕES

- O protocolo de exposição à dose de 7,5mM de PTZ não alterou o comportamento do *zebrafish* relacionado com crises epiléticas.
- O tratamento modificou a expressão do gene *cfos* nos períodos de 5 dias e 60 dias, indicando que o cérebro pode estar se modificando após 60 dias. Já o gene *kalirin* foi hipoexpresso no período de 15 dias.
- O *zebrafish* não apresentou crises espontâneas com o tratamento aplicado.

## 7. REFERÊNCIAS

Alvestad S, Hammer J, Qu H, Haberg A, Ottersen OP, Sonnewald U. Reduced astrocytic contribution to the turnover of glutamate, glutamine, and GABA characterizes the latent phase in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(8):1775–86.

Baraban SC, Taylor MR, Castro PA, Baier H. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience.* 2005;131(3):759–68.

Baraban SC. Emerging epilepsy models: insights from mice, flies, worms and fish. *Curr Opin Neurol.* 2007;20(2):164–8.

Barbalho PG, Lopes-Cendes I, Maurer-Morelli CV. Indomethacin treatment prior to pentylentetrazole-induced seizures downregulates the expression of il1b and cox2 and decreases seizure-like behavior in zebrafish larvae. *BMC Neurosci.* 2016;17(1):1–9.

Berghmans S, Hunt J, Roach A, Goldsmith P. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 2007.75(1):18-28.

Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J. Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol.* 2014. 253:197–207.

Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods.* 2008. 30;172(2):143-57.

Del Bigio MR. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010. 119(1):55-73.

Dhir A. Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Curr Protoc Neurosci.* 2012;1(SUPPL.58):1–12.

Du XF, Du JL. A Death Trap for Microglia. *Dev Cell.* 2016, 25;38(2):120-1.

Duy PQ, Berberoglu MA, Beattie CE, Hall CW. Cellular responses to recurrent pentylentetrazole-induced seizures in the adult zebrafish brain. *Neuroscience*, 2017. 349:118–27.

Engel J Jr, Pitkanen A, Loeb JA, Dudek FE, Bertram EH III, Cole AJ, Moshé SL, Wiebe S, Jensen FE, Mody I, Nehlig A, Vezzani A. Epilepsy biomarkers. *Epilepsia*, 2013. 54 (Suppl 4): 61-9.

Falco-walter JJ, Sche IE, Fisher RS. The new de fi nition and classi fi cation of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* 2018;139(July 2017):73–9.

Fisher RS, Van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 2005;46(4):470–2.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia.* 2014;55(4):475–82.

Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2017;58(4):522–30.

Fishman MC. Zebrafish - the canonical vertebrate. *Science*. 2001 Nov 9;294(5545):1290-1

Gazzaniga MS, Ivry RB, Mangun GR. *Neurociencia Cognitiva - A biologia da mente*, editora Artmed, 2a edição, 1998, pag 49-79.

Ghosh S, Hui S. Regeneration of Zebrafish CNS: Adult Neurogenesis. *Neural Plast*. 2016; 2016:5815439.

Goddard, GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol*. 1969;330:295–330.

Gomes FCA, Tortelli VP, Diniz, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. *Estudos Avançados*, 2013. 27(77), 61-84

Gorter JA, van Vliet EA, Lopes da Silva FH. Which insights have we gained from kindling and SE models? *J Neurosci Methods*. 2016;260:96–108.

Hamling KR, Tobias ZJ, Weissman TA. Mapping the development of cerebellar Purkinje cells in zebrafish. *Dev Neurobiol*. 2015. 75(11):1174-88.

Herrera DG, Robertson HA. Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology*. 1996; 50 (2-3): 83-107.

Herring BE, Nicoll RA. Kalirin and Trio proteins serve critical roles in excitatory synaptic transmission and LTP. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(8):2264–9.

Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self, DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler, E J. Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron*, 1994. 13:1235–1244.

Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496 (7446):498–503.

Huberfeld G, Blauwblomme T, Richard M. Hippocampus and epilepsy: findings from human tissues. *Rev Neurol (Paris)*, 2015. 171(3):236-51.

Hunt RF, Hortopan GA, Gillespie A, Baraban SC. A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. 2013;237(1):199–206.

Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, Bueno-Junior LS, Leite JP. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014. 9;10:1693-705.

Kauffman MA, Moron DG, Consalvo D, Bello R KS. Association study between interleukin 1b gene and epileptic disorders: a HuGe review and meta-analysis. *Genet Med*. 2008;10(2):83–8.

Kiessling M, Gass P. Immediate early gene expression in experimental epilepsy. *Brain Pathology*, 1993. vol. 3, no. 4, pp. 381-393.

Kizil C, Dudczig S, Kyritsis N, Machate A, Blaesche J, Kroehne V, Brand M. The chemokine receptor *cxcr5* regulates the regenerative neurogenesis response in the adult zebrafish brain. *Neural Dev*. 2012. 23;7:27.

Kizil C, Iltzsche A, Kaslin J, Brand M. Micromanipulation of gene expression in the adult zebrafish brain using cerebroventricular microinjection of morpholino oligonucleotides. *J Vis Exp*. 2013. 23;(75).

Knogler LD, Markov DA, Dragomir EI, Štih V, Portugues R. Sensorimotor Representations in Cerebellar Granule Cells in Larval Zebrafish Are Dense, Spatially Organized, and Non-temporally Patterned. *Curr Biol*. 2017. 8;27(9):1288-1302.

Kyrousi C, Lygerou Z, Taraviras S. How a radial glial cell decides to become a multiciliated ependymal cell. *Glia*, 2017. 65(7):1032-1042.

Lévesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013. 37(10 Pt 2):2887-99.

Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*, 2007. 8(5):353-367.

Löscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 2002;50:105–23.

Löscher W, Brandt C. Prevention or Modification of Epileptogenesis after Brain Insults: Experimental Approaches and Translational Research. *Pharmacol Rev*, 2010;62(4):668–700.

Löscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res*. 2017. 42(7):1873-1888.

Lyons DA, Talbot WS. Glial cell development and function in zebrafish. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. 2014 Nov 13;7(2):a020586.

Ma X-M, Huang J, Wang Y, Eipper B a, Mains RE. Kalirin, a multifunctional Rho guanine nucleotide exchange factor, is necessary for maintenance of hippocampal pyramidal neuron dendrites and dendritic spines. *J Neurosci*. 2003;23(33):10593–603.

Ma XM, Wang Y, Ferraro F, Mains RE, Eipper B. Kalirin-7 Is an Essential Component of both Shaft and Spine Excitatory Synapses in Hippocampal Interneurons. *J Neurosci*. 2008;28(3):711–24.

Madsen TM, Bolwig TG, Mikkelsen JD. Differential regulation of c-fos and fosB in the rat brain after amygdala kindling. *Cell Mol Neurobiol*. 2006;26(1):87–100.

Mandela P, Ma XM. Kalirin, a key player in synapse formation, is implicated in human diseases. *Neural Plast*. 2012;2012.

McPherson CE, Eipper BA, Mains RE. Kalirin expression is regulated by multiple promoters. *J Mol Neurosci*. 2004;22(1–2):51–62.

Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 1987; 10;237(4811):192-7.

Mussulini BHM, Leite CE, Zenki KC, Moro L, Baggio S, Rico EP, et al. Seizures Induced by Pentylentetrazole in the Adult Zebrafish: A Detailed Behavioral Characterization. *PLoS One*. 2013;8(1):1–9.

Nestler EJ, Kelz MB, Chen J.  $\Delta$ FosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Research*, 1999. 835: 10-17.

Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach. *Epilepsia*. 2010;51(5):883–90.

Ogino T, Sawada M, Takase H, Nakai C, Herranz-Pérez V, Cebrián-Silla A, Kaneko N, García-Verdugo J, Sawamoto K. Characterization of multiciliated ependymal cells that emerge in the neurogenic niche of the aged zebrafish brain. *J Comp Neurol*, 2016 15;524(15):2982-92.

Petroff OAC. Book Review: GABA and Glutamate in the Human Brain. *The Neuroscientist*, 2002. Vol 8, Issue 6, pp. 562 – 573

Pichler FB, Laurenson S, Williams LC, Dodd A, Copp BR, Love DR. Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish. *Nat Biotechnol*, 2003;21(8):879–83.

Pitkänen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol*. 2002 Jul;1(3):173-81

Pitkänen A, Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol*. 2011;10(2):173–86.

Pitkänen A, Lukasiuk K, Dudek FE, Staley KJ. Epileptogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015. 18;5 (10).

Preston MA, Macklin WB. Zebrafish as a model to investigate CNS myelination. *Glia*, 2015. 63(2):177-93.

Puigdellívol M, Cherubini M, Brito V, Giralt A, Suelves N, Ballesteros J, et al. A role for Kalirin-7 in corticostriatal synaptic dysfunction in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2015;24(25):7265–85.

Raj B, Wagner DE, McKenna A, Pandey S, Klein AM, Shendure J, Gagnon JA, Schier AF. Simultaneous single-cell profiling of lineages and cell types in the vertebrate brain. *Nature Biotechnology*, 2018. 36(5):442-450.

Remmers C, Sweet R.A PP. Abnormal Kalirin Signaling in Neuropsychiatric Disorders. *Brain Res Bull*. 2014;(1):1–23.

Rojas A, Jiang J, Ganesh T, Yang M, Lelutiu N, Gueorguieva P, Dingledine R. Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(1):17–25.

Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A, Steve White H. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem Int*. 2012;61(4):546–58.

Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512–21.

Sharma AK, Searfoss GH, Reams RY, Jordan WH, Snyder PW, Chiang AY, et al. Kainic acid-induced f-344 rat model of Mesial temporal lobe epilepsy: gene expression and canonical Pathways. *Toxicol Pathol*. 2009;37(6):776–89.

Shin E, Jeong J, Chung Y. Kainate-Induced Wet Dog Shake Behavior in Genetically Epilepsy-Prone Rats: Possible Involvement of an Impaired Synaptic Transmission to the 5-HT<sub>2A</sub> Receptor. *J Pharmacol Sci*. 2009;110:401-4.

Sierra A, Grohn O, Pitkanen A. Imaging microstructural damage and plasticity in the hippocampus during epileptogenesis. *Neuroscience*, 2015. 19;309:162-72.

Sousa C; Biber K; Michelucci A. Cellular and Molecular Characterization of Microglia: A Unique Immune Cell Population. *Front Immunol*. 2017; 8:198

Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev*. 2008;83(1):13–34.

Stables JP, Bertram E, Dudek FE, Holmes G, Mathern G, Pitkanen A, et al. Therapy Discovery for Pharmacoresistant Epilepsy and for Disease-modifying Therapeutics: Summary of the NIH/NINDS/AES Models II Workshop. *Epilepsia*. 2003;44(12):1472–8.

Swartz CM. A mechanism of seizure induction by electricity and its clinical implications. *J ECT*. 2014. 30(2):94-7

Teng Y, Xie X, Walker S, Rempala G, Kozlowski DJ, Mumm JS, Cowell JK. Knockdown of zebrafish *Lgi1a* results in abnormal development, brain defects and a seizure-like behavioral phenotype. *Hum Mol Genet*. 2010 Nov 15;19(22):4409-20.

Terrone G, Pauletti A, Pascente R, Vezzani A. Preventing epileptogenesis: A realistic goal? *Pharmacol Res*, 2016. (110) 96-100.

Than-Trong E, Bally-Cuif L. Radial glia and neural progenitors in the adult zebrafish central nervous system. *Glia*. 2015 Aug;63(8):1406-28.

Thurman DJ, Beghi E, Begley CE, Berg AT, Buchhalter JR, Ding D, et al. ILAE EPIDEMIOLOGY COMMISSION REPORT Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy *Epidemiologic Methods for the. Epilepsia*. 2011;52(1):2–26.

Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, Shorvon S, Lowenstein D. A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*. 2015. 56(10):1515-23.

Tsuchiya K, Kogure S. Fast Fourier transformation analysis of kindling-induced afterdischarge in the rabbit hippocampus. *Epilepsy Res*. 2011;95(1–2):144–51.

van Karnebeek CD, Tiebout SA, Niermeijer J, Poll-The BT, Ghani A, Coughlin CR, Van Hove JL, Richter JW, Christen HJ, Gallagher R, Hartmann H, Stockler-Ipsiroglu S. Pyridoxine-Dependent Epilepsy: An Expanding Clinical Spectrum. *Pediatr Neurol*. 2016. 59:6-12.

Vasile F, Dossi E, Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct*. 2017. 222(5):2017-2029.

Venero Galanternik M, Castranova D, Gore AV, Blewett NH, Jung HM, Stratman AN, Kirby MR, Iben J, Miller MF, Kawakami K, Maraia RJ, Weinstein BM. A novel perivascular cell population in the zebrafish brain. *Elife*. 2017 Apr 11;6.

Wang L, Hauser ER, Shah SH, Pericak-Vance MA, Haynes C, Crosslin D, et al. Peakwide Mapping on Chromosome 3q13 Identifies the Kalirin Gene as a Novel Candidate Gene for Coronary Artery Disease. *Am J Hum Genet*. 2007;80 (4):650–63.

Westerfield M. *The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of the zebrafish (Danio rerio)*, 4th edition. Eugene. OR: University of Oregon, Institute of Neuroscience, 2000.

Westmoreland BF. Epileptiform electroencephalographic patterns. *Mayo Clin Proc*. 1996; 71(5):501-11.

WHO, 2018. Epilepsy. WHO Fact sheet, no. 999.

Xiong W, Ping X, Gao J, Jin X. Preparing undercut model of posttraumatic epileptogenesis in rodents. *J Vis Exp*. 2011;(55):1–4.

Yan Y, Eipper BA, Mains RE. Kalirin-9 and kalirin-12 play essential roles in dendritic outgrowth and branching. *Cereb Cortex*. 2015;25(10):3487–501.

Zabinyakov N, Bullivant G, Cao F, Fernandez O, Jia Z, Wen XY, Dowling JJ, Salomons GS, Mercimek-Andrews S. Characterization of the first knock-out *aldh7a1* zebrafish model for pyridoxine-dependent epilepsy using CRISPR-Cas9 technology. *PLoS One*, 2017. 20;12(10)

## 8. ANEXO



CEUA/UNICAMP

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Investigação eletrográfica, comportamental e molecular em zebrafish (Danio rerio) exposto a doses subconvulsivantes de Pentilenotetrazol (PTZ) com objetivo de indução ao modelo de kindling", protocolo nº 4037-1, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Claudia Vianna Maurer Morelli / Katia Silva de Brito, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 19 de outubro de 2015.

Vigância do projeto: 02/2016-06/2016

Espécie/Linhagem: Peixe / Danio rerio

No. de animais: 80

Idade/Peso: 06 meses / 2g

Sexo: 40 machos/40 fêmeas

Origem: Biotério do Laboratório de Zebrafisch, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 19 de outubro de 2015.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva