



FERNANDA CHRISTINA REIS PINTO

**AVALIAÇÃO DOS GENES *bdnf* e *ntkr2* EM MODELO  
ANIMAL *Danio rerio* (ZEBRAFISH) INDUZIDO À CRISE  
EPILEPTICA POR PENTILENOTETRAZOL**

**CAMPINAS**

**2013**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADES DE CIÊNCIAS MÉDICAS

FERNANDA CHRISTINA REIS PINTO

**AVALIAÇÃO DOS GENES *bdnf* e *ntrk2* EM MODELO ANIMAL  
*Danio rerio* (ZEBRAFISH) INDUZIDO À CRISE EPILÉPTICA POR  
PENTILENOTETRAZOL**

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cláudia Vianna Maurer-Morelli

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA FERNANDA CHRISTINA REIS PINTO E ORIENTADO PELA PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. CLÁUDIA VIANNA MAURER-MORELLI.

-----  
Assinatura do Orientador

**CAMPINAS**

**2013**

## Ficha catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

R277a Reis-Pinto, Fernanda Christina, 1988-  
Avaliação dos genes *bdnf* e *ntkr2* em modelo animal  
*Danio rerio* (Zebrafish) induzido à crise epiléptica por  
pentilenotetrazol / Fernanda Christina Reis Pinto. --  
Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Cláudia Vianna Maurer-Morelli.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Epilepsia. 2. *Zebrafish*. 3. Fator neurotrófico  
derivado do cérebro. 4. Pentilenotetrazol. 5. Reação em  
cadeia da polimerase em tempo real. I. Maurer-Morelli,  
Claudia Vianna, 1966-. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

### Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Evaluation of *bdnf* and *ntkr2* transcript profile in adult zebrafish brain after Pentylenetetrazole-evoked seizure.

**Palavras-chave em inglês:**

Epilepsy

Zebrafish

Brain-derived neurotrophic factor

Pentylenetetrazole

Real-time polymerase chain reaction

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Mestra em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Cláudia Vianna Maurer-Morelli [Orientador]

Iscia Lopes Gendes

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

**Data da defesa:** 04-03-2013

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

## Folha de aprovação

---

### BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

FERNANDA CHRISTINA REIS PINTO

---

---

Orientador (a) PROF(A). DR(A). CLÁUDIA VIANNA MAURER MORELLI

---

---

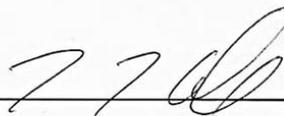
#### MEMBROS:

---

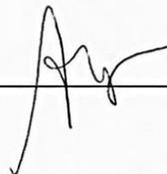
1. PROF(A). DR(A). CLÁUDIA VIANNA MAURER MORELLI



2. PROF(A). DR(A). ISCIA LOPES CENDES



3. PROF(A). DR(A). ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA



---

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

Data: 04/03/2013



## **DEDICATÓRIA**

“Dedico especialmente aos meus pais e irmã. Pelo seu investimento, envolvimento e comprometimento em ajudar no meu crescimento físico, emocional e espiritual sem o que, certamente, não teria conseguido chegar até aqui.”



## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço primeiramente a Deus, que é o engenheiro de toda nossa genética.

Agradeço aos meus pais, pelo incentivo e comprometimento de sempre. Pelos conselhos e ensinamentos sempre prontos e na hora que eu preciso. Vocês sabem a diferença que fazem na minha vida!

Agradeço a minha queridíssima irmã, que mesmo longe sempre me apoiou e me fez companhia. Sinto sua falta, volta logo! Você sabe o quão importante é na minha vida! Te amo muito!

Agradeço à minha querida orientadora *Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Cláudia V. Maurer-Morelli*, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim durante todo esse tempo, por me orientar, ensinar, incentivar e principalmente por acreditar em mim. Muito, mas muito obrigada!

Agradeço à *Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup>. Iscia Lopes-Cendes* e ao *Prof.Dr<sup>o</sup>. Alexandre Oliveira* pelas preciosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento desta dissertação.

Agradeço aos amigos do LabZeb: Paty, Rafa e Marlon. Muito obrigada pelo apoio, ensino e ajuda de sempre no laboratório e fora dele. Muito obrigada pela agradável e divertida convivência desses anos.

Agradeço á todos os amigos do laboratório, que sempre tiveram dispostos a ajudar, ensinar e sempre foram muito pacientes. Muito obrigada pelos divertidos aniversários, cinemas e almoços que me ajudaram a distrair um pouco as preocupações da dissertação.

Aos funcionários da limpeza, da informática, do espaço gourmet, aos seguranças, muito obrigado por manter a Faculdade de Ciências Médicas um lugar ótimo para trabalhar e viver.

Agradeço de forma especial a *Aninha*, uma amiga que mesmo longe e com a diferença de horário sempre estava disponível para me dar dicas e conselhos sobre meus erros e acertos do dia-a-dia. Obrigada pela paciência!

Agradeço também o suporte financeiro (FAEPEX – Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão) recebido para o desenvolvimento deste estudo.

A todos vocês... o meu MUITO obrigada!!!

“O justo é como árvore plantada junto a ribeiros de águas, que, no devido tempo, dá o seu fruto, e cujas folhas não murcham; e tudo quanto ele faz será bem sucedido” Salmos 1:3



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ADPEAF	<i>Autosomal Dominant Partial Epilepsy with Auditory</i> (Epilepsia do Lobo Temporal Lateral Autossômica Dominante)
BDFN	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de cálcio
CNT	Controle
DAEs	Drogas anti-epilépticas
dNTP	Dexorribonucleotídeo trifosfatada
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EEG	Eletroencefalografia
EF1A	<i>Elongation factor-1 alpha</i>
EH	Esclerose Hipocampal
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
ELTM	Epilepsia do Lobo Temporal Medial
ELTMF	Epilepsia do Lobo Temporal Medial Familiar
GABA	<i>Gamma-Amino Butyric Acid</i> (Ácido gama-aminobutírico)
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
LGI1	<i>Leucine-rich, glioma-inactivated 1 gene</i>
Lgi1a	<i>Leucine-rich, glioma-inactivated 1 gene, type A</i>
Lgi1b	<i>Leucine-rich, glioma-inactivated 1 gene, type B</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> (Fator do crescimento do nervo)
NT	Neurotrofina
NT-3	<i>Neurotrophin-3</i> (Neurotrofina 3)
NT-4	<i>Neurotrophin-4</i> (Neurotrofina 4)
NT-6	<i>Neurotrophin-6</i> (Neurotrofina 6)
NT-7	<i>Neurotrophin-7</i> (Neurotrofina 7)
NTRK2A	<i>Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor, type 2A</i>

NTRK2B	<i>Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor, type 2B</i>
p75 <sup>NTR</sup>	<i>p75 neurotrophin receptor (Receptor de Neurotrofina p75)</i>
PI-3-Kinase	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PLC- $\gamma$	<i>Phospholipase C - gamma</i>
PTZ	Pentilenotetrazol
qPCR	PCR quantitativo
QR	Quantificação Relativa
Rap-1	<i>Ras-proximate-1 / Ras-relatedprotein1</i>
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TRK	<i>Tropomyosin - ReceptorKinase(Receptor de TropomiosinaQuinase)</i>
ZFIN	<i>The Zebrafish Information Network</i>
ZIRC	<i>Zebrafish International Resource Center</i>

## LISTA DE TABELAS

---

**Tabela 1 - Média da quantificação relativa (QR) dos genes *bdnf*, *ntrk2a* e *ntrk2b* para o controle endógeno *18S* nos diferentes tempos pós crise epiléptica induzida por PTZ..... 58**

**Tabela 2 - Média da quantificação relativa (QR) dos genes *bdnf*, *ntrk2a* e *ntrk2b* para o controle endógeno *ef1a* nos diferentes tempos pós crise epiléptica induzida por PTZ..... 63**



## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1 – Interações entre neurotrofinas e receptor ..... 41**
- Figura 2 – Imagem de gel de agarose para exemplificar a integridade do RNA total obtido a partir de tecido cerebral total de *zebrafish*..... 57**
- Figura 3 – Figura da via de sinalização do *bdnf*..... 79**



## LISTA DE GRÁFICOS

---

**Gráfico 1 - Análise dos transcritos do gene *bdnf* em encéfalo de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol quando comparado com o grupo controle ..... 60**

**Gráfico 2 - Análise dos transcritos do gene *ntrk2a* em encéfalo de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol quando comparado com o grupo controle ..... 60**

**Gráfico 3 - Análise dos transcritos do gene *ntrk2b* em encéfalo de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol quando comparado com o grupo controle ..... 61**

**Gráfico 4 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crise epiléptica por pentilenotetrazol..... 62**

**Gráfico 5 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crise epiléptica por pentilenotetrazol para o grupo controle..... 62**

**Gráfico 6 - Análise dos transcritos do gene *bdnf* em encéfalo de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol quando comparado com o grupo controle ..... 65**

**Gráfico 7 - Análise dos transcritos do gene *ntkr2a* em encéfalo de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol quando comparado com o grupo controle ..... 65**

**Gráfico 8 - Análise dos transcritos do gene *ntkr2b* em encéfalo de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol quando comparado com o grupo controle ..... 66**

**Gráfico 9 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crise epiléptica por pentilenotetrazol..... 66**

**Gráfico 10 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crise epiléptica por pentilenotetrazol para o grupo controle..... 67**

**Gráfico 11 - Análise dos transcritos do gene *bdnf* em encéfalo de *zebrafish* após crises epilépticas repetidas induzidas por pentilenotetrazol (grupo PTZ) quando comparado com o grupo controle (CNT)..... 68**

**Gráfico 12 - Análise dos transcritos do gene *ntkr2a* em encéfalo de *zebrafish* após crises epilépticas repetidas induzidas por pentilenotetrazol (grupo PTZ) quando comparado com o grupo controle (CNT)..... 68**

**Gráfico 13 - Análise dos transcritos do gene *ntkr2b* em encéfalo de *zebrafish* após crises epilépticas repetidas induzidas por pentilenotetrazol (grupo PTZ) quando comparado com o grupo controle (CNT)..... 69**

**Gráfico 14 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crises epilépticas repetidas por pentilenotetrazol..... 69**

**Gráfico 15 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crises epilépticas repetidas por pentilenotetrazol para o grupo controle..... 70**

**Gráfico 16 - Análise dos transcritos do gene *bdnf* em encéfalo de *zebrafish* após crises epilépticas repetidas induzidas por pentilenotetrazol (grupo PTZ) quando comparado com o grupo controle (CNT)..... 71**

**Gráfico 17 - Análise dos transcritos do gene *ntkr2a* em encéfalo de *zebrafish* após crises epilépticas repetidas induzidas por pentilenotetrazol (grupo PTZ) quando comparado com o grupo controle (CNT)..... 71**

**Gráfico 18 - Análise dos transcritos do gene *nrk2b* em encéfalo de *zebrafish* após crises epiléticas repetidas induzidas por pentilenotetrazol (grupo PTZ) quando comparado com o grupo controle (CNT)..... 72**

**Gráfico 19 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crises epiléticas repetidas por pentilenotetrazol..... 72**

**Gráfico 20 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crises epiléticas repetidas por pentilenotetrazol para o grupo controle ..... 73**

## SUMÁRIO

---

RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xxvii
1. INTRODUÇÃO .....	29
1.1. <i>As epilepsias</i> .....	29
1.2. <i>As formas mais comuns de epilepsia em adulto e sua importância</i> .....	30
1.3. <i>Os modelos animais em epilepsia</i> .....	32
1.3.1. <i>O modelo do Danio rerio (Zebrafish)</i> .....	34
1.3.2. <i>Zebrafish e estudos das epilepsias</i> .....	36
1.4. <i>Neurotrofinas</i> .....	38
1.4.1. <i>BDNF</i> .....	43
1.4.2. <i>BDNF e Epilepsia</i> .....	44
1.5. <i>Justificativa</i> .....	46
2. OBJETIVOS.....	47
3. MÉTODOS .....	49
3.1. <i>Aquisição e Manutenção dos animais</i> .....	49
3.2. <i>Indução da epilepsia no zebrafish com PTZ</i> .....	50
3.3. <i>Grupos experimentais e coleta dos encéfalos</i> .....	50
3.4. <i>Análise molecular dos genes bdnf e ntkr2</i> .....	51

3.4.1. <i>Protocolo de Extração do RNA Total</i> .....	51
3.4.2. <i>Protocolo da RT (Transcriptase Reversa)</i> .....	52
3.4.3. <i>Protocolo da PCR em Tempo Real</i> .....	53
3.4.4. <i>Análise estatística</i> .....	54
3.5. <i>Comitê de Ética</i> .....	54
4. RESULTADOS.....	55
4.1. <i>Adequação dos cuidados e manutenção dos animais</i> .....	55
4.2. <i>Indução de crises por PTZ e obtenção do encéfalo</i> .....	56
4.3. <i>Extração de RNA total do encéfalo de zebrafish</i> .....	56
4.4 <i>RT-qPCR</i> .....	57
5. DISCUSSÃO .....	75
6. CONCLUSÕES .....	85
7. REFERÊNCIAS.....	87

## RESUMO

---

O uso de modelos animais tem trazido grandes benefícios para o conhecimento dos processos biológicos normais, bem como para uma maior compreensão das doenças humanas, inclusive as epilepsias. Embora os modelos de roedores sejam os mais usados para explorar os mecanismos que permeiam a epileptogênese, recentemente, um novo modelo animal foi proposto para o estudo das epilepsias, o *Daniorerio*. Popularmente conhecido como *zebrafish*, este pequeno peixe possui muitas vantagens para a experimentação científica, principalmente no que se refere à manipulação genética. O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF, do inglês, *BrainDerivedNeurotrophicFactor*) é a neurotrofina de maior abundância no sistema nervoso central e que está relacionada à plasticidade neuronal. Sabe-se que os níveis de transcritos e proteicos desta neurotrofina estão alterados nas epilepsias, tanto em humanos quanto em modelos animais; porém, o seu papel nesta condição ainda é controverso. Os principais objetivos deste estudo foram (i) investigar o perfil temporal de transcritos dos genes *bdnfe* seus receptores *ntrk2a* e *ntrk2b* após crise epiléptica aguda e (ii) após crises epilépticas repetitivas por meio da técnica da PCR quantitativa (qPCR) usando-se o sistema TaqMan™ (*AppliedBiosystems, Foster City*). As crises epilépticas foram induzidas quimicamente por Pentilenotetrazol (PTZ) em animais adultos e seus encéfaloscoletados nos tempos: (i) 0,05h, 12h, 24h, 48h, 72h pós-crise aguda e (ii) uma semana após indução de crise diária por cinco dias consecutivos. Os resultados mostraram que

as crises epilépticas modificaram o perfil de expressão das neurotrofinas e apontou para um aumento dos níveis de RNAm do gene *bdnf* no tempo 0,05h ( $p=0,01$ ) que não é descrito em outros modelos. É importante salientar que esses resultados mostram que, no encéfalo do *zebrafish*, as neurotrofinas estão relacionadas com uma atividade neuronal anormal como em outros modelos animais e em humanos. Este é o primeiro estudo a investigar os níveis de transcritos do gene *bdnf* e seus receptores no encéfalo do *zebrafish*, contribuindo para a caracterização deste animal como modelo para estudos das epilepsias.

## ABSTRACT

---

Animal models have been contributing to a better understanding of human diseases, including epilepsies. Although rodent models are common organisms used to investigate the mechanisms underlying epileptogenesis, recently, *Danio rerio* has gained attention as a promising model for epilepsy studies. Popular named as zebrafish, this little fish has many advantages for scientific investigation, especially those related to genetic manipulations. BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) is the main neurotrophic factor in the central nervous system and it is related to neuronal plasticity. It has been reported that both BDNF transcript and protein levels are increased after seizures in patients and experimental models; however, the temporal transcript profile of the BDNF in the zebrafish brain is unknown. The main aim of this study was to investigate the transcripts profile of *bdnf*, and *ntkr2antrk2b* genes by quantitative PCR (qPCR) using TaqMan™ system (Applied Biosystems, Foster City), (i) after a single seizure and (ii) repetitive seizures. Seizures were chemically induced by Pentylentetrazole (PTZ) in adult animals and their brains collected at (i) 0,05h, 12h, 24h, 48h, 72h after acute seizure and (ii) one week after single seizure/day by five consecutive days. Our results showed that in the zebrafish brain, changes in neurotrophins transcript levels were related to an abnormal neuronal activity as seems in other experimental models and patients and presented an increase of *bdnf* mRNA levels at 0,05h ( $p=0.01$ ) described for the first time. This is the first

study exploring transcript profile of neurotrophins in zebrafish brain and contributes to characterize it as a model for epilepsy studies.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *As epilepsias*

As epilepsias encontram-se entre as doenças neurológicas mais comuns, que atingem aproximadamente 2% da população geral, e por isso são consideradas, pela Organização Mundial de Saúde, um problema de saúde pública (1). As epilepsias são uma condição crônica, caracterizada pela presença de crises epiléticas recorrentes, na ausência de eventos externos desencadeantes, como por exemplo febre, drogas ou distúrbios metabólicos (2). Essas crises epiléticas são caracterizadas por uma descarga elétrica anormal, sincronizada e súbita dos neurônios cerebrais e que causa um distúrbio intermitente no sistema nervoso central (3, 4).

A *International League Against Epilepsy* (ILAE) propõe a seguinte classificação das epilepsias quando considerada sua etiologia:

- Genéticas (antiga classificação idiopática) – epilepsias com predisposição genética;
- Estrutural-metabólica (antiga classificação sintomática) – epilepsias com lesão identificável no cérebro;
- Desconhecida (antiga classificação criptogênica) – epilepsias se uma lesão identificável ou sem causa genética provável que se relaciona com a origem das crises epiléticas.

Já as crises epiléticas são classificadas em generalizadas, focais ou desconhecidas (5).

A classificação das epilepsias é baseada nas semelhanças em relação aos sinais clínicos ou neurológicos, histórico familiar, prognóstico, idade de início, achados eletroencefalográficos e o tipo de crise. As crises epiléticas podem ter origens diferentes e dependendo da área afetada podem apresentar sintomas motores, sensoriais ou mentais associados ou não à consciência (6, 7).

### ***1.2. As formas mais comuns de epilepsia em adulto e sua importância***

A forma de maior ocorrência entre os adultos é a epilepsia do lobo temporal (ELT). A ELT é uma síndrome de grande importância clínica, não somente porque apresenta uma alta incidência, mas por ser frequentemente refratária ao tratamento medicamentoso, sendo necessária, muitas vezes, a intervenção cirúrgica para a retirada do foco epilético como forma de controle das crises (6, 8). A ELT foi definida pela ILAE, em 1989, como a epilepsia caracterizada por crises espontâneas recorrentes originadas do lobo temporal lateral ou medial.

Cerca de 60% de todos os casos de ELT correspondem à epilepsia do lobo temporal medial (ELTM) (6), que apresenta um perfil clínico bem definido e cujas crises epiléticas mais características são as parciais complexas. Estas podem

apresentar auras, sensações epigástricas ascendentes, medo súbito, crises autonômicas (como palpitações e piloereção) e sensações tipo *déjà vu*(6, 9).

A ELTM tem sido associada a um insulto inicial como crise febril e traumas; no entanto, em 2001, Kobayashi e colaboradores identificaram um tipo distinto de ELTM com recorrência familiar, mas baixa frequência de crises febris conhecida como ELTM familiar (ELTMF) (8) e para a qual há uma predisposição genética para o desenvolvimento da lesão hipocampal. De fato, um *locus* (18p11.31) foi recentemente descrito para este tipo de epilepsia familiar (10). As crises epiléticas na ELTM são originadas nas estruturas mediais do cérebro (como o hipocampo, amígdala e o giro parahipocampal) e é comum a associação com a esclerose hipocampal (EH) (11, 12).

As principais alterações estruturais encontradas na EH são alterações histológicas como a perda neuronal, principalmente nas áreas CA1, CA3 (as células da região CA2 são mais resistentes), dispersão das células granulares do giro denteado e gliose (caracterizada pela hipertrofia e proliferação de corpos celulares gliais) (13-15).

Uma pequena porcentagem das ELT pode ser representada pela Epilepsia do Lobo Temporal Lateral Autossômica Dominante (ADPEAF - *Autosomal Dominant Partial Epilepsy with Auditory Features*). A característica da ADPEAF são as crises parciais que estão associadas a auras auditivas ou sensoriais, que são alucinações de vozes, pessoas, músicas, cheiros e até gostos, que podem durar de um a dois minutos (16). É importante ressaltar que o gene

*LGI1* (*leucine-rich, glioma-inactivated 1 gene*) localizado no cromossomo 10q24 foi clonado e identificado como responsável pela ADPEAF (17), uma síndrome com recorrência familiar caracterizada por fenômenos auditivos, mas com bom controle das crises (18).

### **1.3. Os modelos animais em epilepsia**

O uso de modelos animais tem trazido grandes benefícios para o conhecimento dos processos biológicos normais, bem como para uma maior compreensão das doenças humanas.

Nas últimas décadas houve uma busca frequente de novos modelos animais que imitem as características patológicas das epilepsias, de forma a melhorar os conhecimentos básicos da doença (19). A utilização de animais experimentais pode ajudar em uma maior compreensão dos mecanismos moleculares e funcionais, resultando em novas e avançadas estratégias para o tratamento de doenças (7).

Vários tipos de animais já foram utilizados para o estudo das epilepsias, como macacos, gatos, cachorros, peixes, coelhos e roedores, sendo que os mais comuns são os roedores, como ratos e camundongos (20-22).

A escolha de um modelo animal depende dos objetivos do trabalho. Existem duas abordagens diferentes para se estudar os fenômenos da epilepsia. A primeira seria induzir uma crise aguda, onde somente haverá crise epiléptica na

presença de um indutor, e a segunda abordagem é a indução de várias crises em intervalos de tempo variáveis (19).

Os modelos experimentais para induzir uma crise aguda utilizam drogas convulsivantes ou estimulação elétrica, lembrando sempre que o modelo agudo reproduz a crise epiléptica e não a epilepsia (23). Em roedores, uma droga bastante utilizada é o ácido Caínico. Essa droga tem uma ação glutamatérgica e, quando injetada no hipocampo de roedores, estimula *ostatus epilepticus* (estado de mal epiléptico) (24). A indução do *statusepilepticus* no rato adulto promove uma série de alterações que resultam na ocorrência de crises espontâneas que reproduz a fenomenologia encontrada na ELTM em humanos (insulto inicial – fase latente – aparecimento espontâneo das crises). Outro modelo muito conhecido e utilizado é o abrasamento ou *Kindling* (forma inglesa), que consiste em um aumento da excitabilidade neuronal, transformando esses neurônios em “neurônios patológicos” que são capazes de gerar crises epilépticas espontâneas. O abrasamento é caracterizado pela estimulação elétrica ou química, de várias estruturas do sistema límbico, como o hipocampo e a amígdala, por repetidas vezes (7).

Há ainda outro modelo experimental que mimetiza a ELTM e que utiliza pilocarpina, um potente agonista muscarínico isolado de folhas da planta Jaborandi (*P. mycrophyllus*), que como droga convulsivante é capaz de imitar uma crise parcial complexa da ELT (7, 25, 26). A pilocarpina em ratos promove alterações comportamentais e eletrográficas que podem ser divididas em três períodos distintos:

- Período agudo, o animal evolui progressivamente para o *status epilepticus*, (que pode durar até 24h);
- Período silencioso, caracterizado pela normalização progressiva do comportamento e do EEG (pode ter uma duração de 4 a 44 dias);
- Período crônico, aparecimento de crises epiléticas espontâneas e recorrentes (26).

Todos esses modelos têm sido de grande importância na geração de maiores conhecimentos sobre lesões estruturais e mecanismos moleculares envolvidos na geração de um cérebro cronicamente epilético.

Recentemente, um novo modelo animal foi proposto para o estudo das epilepsias, o *Daniorerio* (27).

### **1.3.1. O modelo do *Daniorerio* (*Zebrafish*)**

O *Daniorerio*, também conhecido como *zebrafish* ou peixe Paulistinha, tem sido utilizado para estudos de diferentes doenças humanas e cresce o número de pesquisadores que o empregam nas investigações científicas. Este pequeno peixe é um teleóstio de água-doce cujo tamanho varia de 4 a 5 centímetros (28, 29). Originário da Índia Oriental e Bangladesh, o *Daniorerio* pertence à família *Cyprinidae*. Estetem um comportamento ativo e pacífico, vive em grupos de no mínimo, 10 exemplares. É um peixe muito resistente, tanto em relação a doenças (respeitando-se a manutenção do aquário) quanto em relação aos diferentes

parâmetros de água. É uma espécie bastante conhecida por seu uso ornamental (28, 30).

Por ser um vertebrado, o *zebrafish* é muito mais próximo de humanos do que os vermes e insetos. Por isso, os órgãos desse vertebrado são morfológica e funcionalmente parecidos com os dos seres humanos e, portanto esse modelo animal pode ser usado para caracterizar mecanismos e vias relevantes tanto para as doenças humanas como para fins terapêuticos (31).

Por suas vantagens, o *zebrafish* tornou-se o principal modelo experimental para o estudo do desenvolvimento de vertebrados (32). As características básicas de sua embriogênese são bem conhecidas, assim como o destino celular durante o seu desenvolvimento (33, 34).

Foi somente após a publicação do trabalho de George Streisinger, no começo da década de 80 (35), que o *zebrafish* ficou conhecido como um modelo animal para manipulações genéticas (36). Dentre as características favoráveis que este peixe possui, podemos citar: o baixo custo quando comparado com o de modelos em roedores, o rápido desenvolvimento do embrião, desenvolvimento extra-útero e transparência nas fases de embrião e larvas (o que facilita a visualização e manipulação genética nesta fase) e a grande quantidade de ovos que é obtida diariamente (200-300 ovos) (29, 37, 38).

Além dos aspectos já citados, é importante salientar que os genes ortólogos deste peixe existem para a maioria dos genes humanos. Em 2001, o Instituto Sanger e outros consórcios ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/D\\_rerio](http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio)) iniciaram o

sequenciamento do genoma do *zebrafish*. Embora totalmente sequenciado, mas não completamente anotado, este projeto mostrou que o *zebrafish* possui aproximadamente 85% de seus genes similares aos de humanos contendo largas regiões de conservada sintonia entre os cromossomos do peixe e os dos mamíferos. Este pequeno peixe possui 25 pares de cromossomos, e existem aproximadamente 20% de genes duplicados(31, 39, 40).

Nos últimos anos o uso do *zebrafish* para estudos envolvendo manipulações genéticas cresceu muito. Da necessidade de se organizar os dados obtidos e facilitar a difusão de informações foi criada uma rede de informações na *web* sobre o *zebrafish*, na qual laboratórios do mundo inteiro podem depositar informações sobre esta espécie e/ou localizar importantes informações (41).

### **1.3.2. *Zebrafish* e estudos das epilepsias**

Em 2005, Baraban e colaboradores (27) mostraram que o *zebrafish* poderia ser um novo modelo animal utilizado para pesquisas em epilepsia. Neste estudo, larvas de *zebrafish* com sete dias pós-fertilização (7dpf) foram expostas ao Pentilenotetrazol (PTZ) edescreveram o comportamento, os achados eletrográficos e moleculares provocados por esse agente convulsivante(27, 42). O comportamento evocado pela exposição ao PTZ foi descrito como:

- Fase 1 - aumento de atividade do nado;
- Fase 2 – movimentos circulares vigorosos e
- Fase 3 – breves movimentos estereotipados que lembram uma crise tônico-clônica com posterior perda de postura.

Além disso, tais autores mostraram que o PTZ promove crise de forma dose-dependente, é capaz de exibir comportamentos e atividade eletroencefalográfica que mimetizam crises epiléticas humanas e de modelos animais (evocando descargas ictais e interictais) e induz um aumento dos níveis de RNAm do gene *c-fos* (que é um marcador de atividade neuronal). Neste mesmo ficou evidenciado que drogas anti-epiléticas (DAEs) foram capazes de interromper os achados eletrográficos, sendo as mais efetivas, o ácido valpróico, o diazepam e o clonazepam (27). É importante destacar que o *zebrafish* também tem sido descrito como um ótimo modelo para *screening* de DAEs, sendo possível a observação da diminuição dos efeitos das crises epiléticas induzidas por PTZ para 13 das 14 drogas testadas (43).

Recentemente, Hunt e colaboradores (44) descreveram achados eletrográficos, em larvas de *zebrafish*, induzido por hipertermia. Neste estudo larvas com 5 dias pós fertilização (dpf) mostraram atividade neural similar às de crises epiléticas com um pico de atividade em  $33,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$ , mas com atividades alteradas com temperaturas a partir de  $25,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$  (44).

O primeiro artigo relacionando *zebrafish* como um modelo genético para o estudo das epilepsias foi publicado em 2010, e caracterizou o comportamento e o fenótipo associados com a técnica de *knockdown* do gene *lgi1a*, por meio da técnica de morfolidos (45). É interessante citar que no ano seguinte, esse mesmo grupo de pesquisadores mostrou que apesar do gene *lgi1* ser duplicado no *zebrafish* (*lgi1a* e *lgi1b*), esses genes manifestam diferentes fenótipos quando manipulados pela técnica de *knockdown*. Por exemplo, o *knockdown* do gene *lgi1a* produziu um fenótipo caracterizado por um desenvolvimento anormal, perda celular nos olhos e cérebro, anormalidades na cauda e hiperatividade do nado e comportamento que mimetiza crise epiléptica (45). Já o *knockdown* do gene *lgi1b* produziu hidrocefalia, anormalidades no desenvolvimento, mas não induziu à comportamentos estereotipados de crises epiléticas (46).

Há ainda muito que se estudar e explorar neste “novo” modelo animal, pois as investigações sobre diferentes eventos já conhecidos em outros modelos animais de epilepsia estão apenas começando no *zebrafish*. Os modelos animais nos fornecem uma oportunidade para melhor entendimento dos eventos moleculares e estruturais que permeiam as epilepsias (23).

#### **1.4. Neurotrofinas**

No começo dos anos 50, foi descoberta a primeira neurotrofina: o Fator de Crescimento do Nervo (NGF - *Nerve Growth Factor*) que promove a sobrevivência e crescimento dos neurônios sensoriais e simpáticos (47).

As neurotrofinas (NT) fazem parte de uma família de proteínas (48) que têm como função impedir a apoptose (morte celular programada) e induzir a diferenciação celular de células progenitoras para a formação de novos neurônios, estimulando e controlando a neurogênese (49, 50). Essas moléculas atuam em diferentes regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) e Periférico (SNP), sendo que no SNC, atuam principalmente no hipocampo, uma importante região relacionada com a memória (47, 51).

Existem quatro neurotrofinas que são expressas em mamíferos:

- NGF - Fator de Crescimento do Nervo (*NerveGrowthFactor*) (52);
- BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*BrainDerivedNeurotrophicFactor*) (53);
- NT-3 – Neurotrofina 3 (*Neurotrophin-3*) (54); e
- NT-4 – Neurotrofina 4 (*Neurotrophin-4*) (55).

Os receptores para essas neurotrofinas são: o p75<sup>NTR</sup> – Receptor de neurotrofinas p75 (*p75 neurotrophin receptor*), membro da família de receptores do fator de necrose tumoral e a família do Trk – Receptor de

TropomiosinaQuinase (*Tropomyosin-receptorkinase*), que são receptores de tirosina quinase. Este último se divide em três tipos:

- TrkA = NTRK1
- TrkB = NTRK2
- TrkC = NTRK3

Cada uma dessas neurotrofinas se liga a um ou mais membros da família Trk, por exemplo, as neurotrofinas NGF e NT-3 se ligam com o receptor TrkA; as neurotrofinas BDNF, NT-3 e NT-4 utilizam o receptor TrkB e, a NT-3 também pode ativar o receptor TrkC. Além disso, todas essas neurotrofinas se ligam, com uma menor afinidade, ao receptor p75<sup>NTR</sup> (Figura 1) (50, 56, 57).

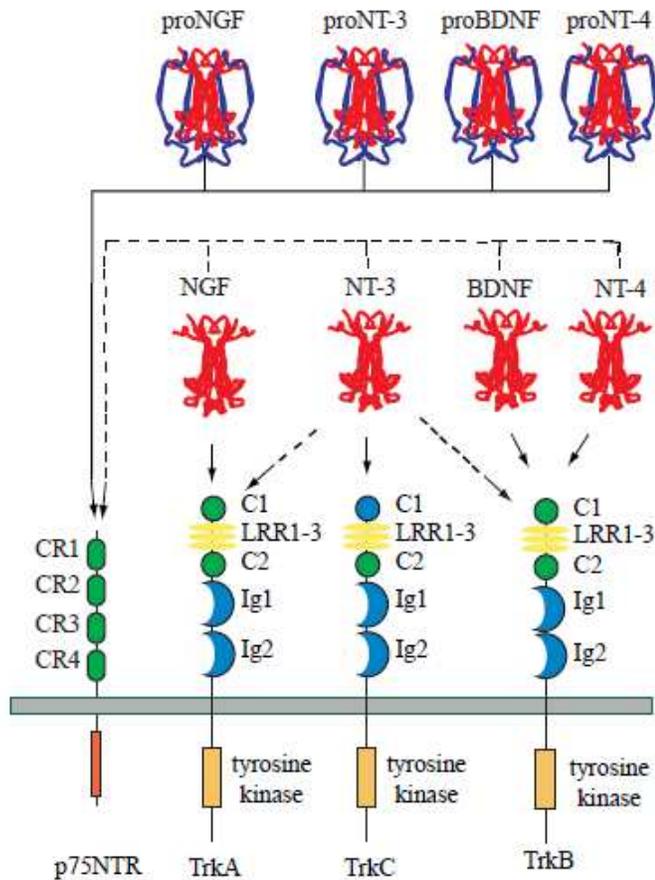


Figura 1– Interações entre neurotrofinas e receptor. Essa figura ilustra as interações importantes de cada uma das quatro neurotrofinas dos mamíferos. Cada pró-neurotrofina se liga ao p75<sup>NTR</sup>, mas não aos receptores da família Trk. Após a maturação através da proteólise das pró-neurotrofinas, cada neurotrofina madura é capaz de ligar e ativar o p75<sup>NTR</sup>, porém apresenta interações específicas com os três receptores Trk. A NGF se liga especificamente ao receptor TrkA; o BDNF e a NT-4 reconhecem o receptor TrkB; a NT-3 ativa o receptor TrkC. Em alguns contextos celulares, a NT-3 é também capaz de ativar TrkA e TrkB, mas com uma menor eficiência. Por simplicidade, apenas as principais isoformas dos receptores Trk são representadas. Emendas diferenciais geram isoformas de TrkB e TrkC, que têm domínios citoplasmáticos truncados nos quais faltam sítios de tirosina quinase. O domínio extracelular de cada receptor Trk resulta na expressão de receptores de peptídeos pequenos com inserções entre a imunoglobulina transmembranar e domínios que afetam a especificidade de ligante. Essa especificidade do ligante também é afetada pela presença de p75<sup>NTR</sup>. (Figura retirada e modificada do artigo de Reichardt, 2006).

As formas maduras das neurotrofinas se ligam aos seus receptores específicos de tirosina-quinase (Trk), promovem sua dimerização e ativação. Já a ligação das neurotrofinas maduras ao receptor p75<sup>NTR</sup> desencadeia cascatas de sobrevivência neuronal, e por sua vez a ligação de pró-neurotrofinas ativa cascatas apoptóticas (58).

Através das neurotrofinas, a cascata de Ras, Rap-1, MAPK (MAP quinase), PI-3-kinase (*phosphatidyl inositol-3 kinase*) e PLC- $\gamma$  (*phospholipase C-C-y*) são ativadas. Estas vias de sinalização estão envolvidas não apenas em mecanismos patológicos como também na modulação da plasticidade fisiológica, como por exemplo, a ativação da MAPK pela NGF na região CA1 dos roedores facilitando a memória dos mesmos (59).

Um papel importante das neurotrofinas é a plasticidade sináptica que, se relacionadas às epilepsias, podem agir tanto como fatores promotores de epileptogênese quanto como substâncias anti-epileptogênicas endógenas (60). A atividade de crise epiléptica pode causar alterações na expressão de fatores de crescimento que duram desde a fase aguda até a fase crônica da epileptogênese (61) e, também, pode alterar a expressão dos receptores de NTs (62).

As neurotrofinas apresentam expressões diferenciadas ao longo do desenvolvimento do SNC. No caso da NT-3, os níveis são maiores nas fases iniciais e diminuem ao longo do desenvolvimento durante o desenvolvimento do sistema nervoso. Quanto aos níveis de BDNF e NGF, ocorre o contrário, havendo um aumento da expressão durante o desenvolvimento. Estas três moléculas

apresentam a expressão que regulam o desenvolvimento e todas são expressas no hipocampo adulto (63).

Em peixe foram descritas outras duas NTs que não são encontradas em mamíferos: a NT-6 – Neurotrofina 6 (*Neurotrophin-6*) e a NT-7 – Neurotrofina 7 (*Neurotrophin-7*) (64, 65).

#### **1.4.1. BDNF**

O segundo membro da família das NTs que foi descoberto em 1982 por Barde e colaboradores é o BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), foi purificado a partir de cérebro de porco (53).

O gene BDNF está localizado, em humanos, no braço curto do cromossomo 11 (11p14.1). Este gene é composto por quatro exons-5' (exons I – IV) que são associados com promotores distintos e um exon-3' que codifica a proteína madura (exon V). Os exons I, II e III são expressos predominantemente no cérebro, enquanto o exon IV é encontrado no coração e pulmão (47).

O BDNF é considerado a principal NT do cérebro, sendo descrito como a neurotrofina mais abundante no SNC, tanto em relação à quantidade quanto a sua distribuição, podendo ser encontrado em uma maior quantidade no hipocampo, cerebelo e córtex cerebral de criança e jovem adulto (66). O BDNF é produzido principalmente pela glia e nos núcleos neuronais (67).

Sua função é controlar a sobrevivência dos neurônios já existentes e potencializar a diferenciação e crescimento dos neurônios novos (neurogênese). Está especialmente envolvido nos processos de aprendizagem e memória (plasticidade neuronal). Esta molécula participa ainda da regulação de mecanismos celulares, crescimento dos axônios e dendritos (sinapse) e da expressão de proteínas (50, 68).

As alterações nos níveis desta neurotrofina estão correlacionadas com uma série de doenças neurológicas, tais como, depressão, epilepsia, doença de Alzheimer, Huntington e Parkinson (69).

#### **1.4.2. BDNF e Epilepsia**

Estudos com roedores adultos mostram que o BDNF é amplamente distribuído no cérebro destes animais, mas apresenta níveis mais altos em estruturas como a formação hipocampal (47). Apesar de haver discordância sobre o papel do BDNF na epilepsia, estudos da ação endógena (70) e exógena (71) do BDNF sugerem que o mesmo tenha um papel protetor.

O aumento da síntese de BDNF desencadeada por insultos em certas populações neuronais também parece ser uma resposta protetora, como uma tentativa de impedir a morte neuronal além da reorganização sináptica (72). O fator de crescimento BDNF participa diretamente da formação normal e aberrante das fibras musgosas e, por isso, é importante no processo epileptogênico. Sua expressão é normalmente encontrada elevada em modelos animais de epilepsia e

em humanos (73). A expressão hipocampal de BDNF induzida por crises epilépticas pode constituir um mecanismo regulatório endógeno capaz de reprimir a epileptogênese hipocampal (74).

Outro papel estudado do BDNF são seus efeitos na excitabilidade. A aplicação de NT-3 e BDNF em cultura de neurônios hipocampais promove aumento do cálcio intracelular e rapidamente aumenta a atividade sináptica, sendo que esta regulação está relacionada a canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo Q e L (75, 76). A ativação de receptores muscarínicos e nicotínicos no hipocampo causa alterações em todas as neurotrofinas. French e colaboradores (77), verificaram que existe um aumento de RNAm de NGF e BDNF e uma diminuição do RNAm de NT-3 após administração de carbacol e pilocarpina. Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos utilizando o modelo de pilocarpina (78, 79). As alterações nos níveis de expressão das neurotrofinas que ocorrem *in vivo* também podem acontecer *in vitro*, como visto em experimentos de cultura de fatias hipocampais de rato que ficaram expostas à pilocarpina por um período de seis horas durante duas semanas (80).

Na ELT humana sabe-se que o aumento de expressão de RNAm de neurotrofinas pelas células granulares está correlacionada tanto com a densidade neuronal (inversamente proporcional à expressão de BDNF) quanto com a quantidade de brotamento (diretamente proporcional à expressão de BDNF e NT-3) (81).

Além disso, sabe-se que a cascata de sinalização promovida pela ligação do BDNF ao seu receptor TrkB previne a apoptose. Ressalte-se que, principalmente depois do cérebro ser exposto a algum tipo de insulto, o plexo coroide apresenta um importante papel na produção das NTs (82).

### **1.5. Justificativa**

O modelo do *zebrafish* em estudos de epilepsia é novo e, portanto, pouco se sabe sobre as alterações promovidas por crises epiléticas agudas ou repetitivas neste animal. Sendo assim, faz-se necessária a caracterização deste modelo quanto a marcadores que são amplamente conhecidos em outros modelos, como por exemplo os roedores. O conhecimento gerado por este trabalho contribui para a caracterização do *zebrafish* como modelo para estudos das epilepsias, além de fornecer dados para uma maior compreensão dos estudos em desenvolvimento pelo nosso grupo e outros que utilizam o modelo do *zebrafish* induzido à crise epilética por PTZ.

## 2. OBJETIVOS

1. Estabelecer a concentração e caracterizar o comportamento da crise epiléptica completa em animais adultos expostos de forma aguda ao PTZ;
2. Avaliar o perfil dos transcritos dos genes *bdnf* e *ntrk2* por RT-qPCR em diferentes tempos após a indução de crise epiléptica por PTZ;
3. Expor o *zebrafish* adulto a crises epilépticas induzidas por PTZ recorrentes e analisar o perfil dos transcritos dos genes *bdnf* e *ntrk2* por RT-qPCR uma semana após a última crise.



### 3. MÉTODOS

#### ***3.1. Aquisição e Manutenção dos animais***

Os peixes adultos foram adquiridos em lojas convencionais e passaram por um período de quarentena em aquário de 30L (no máximo 3 peixes por litro de água) antes de serem usados nos estudos (83).

As condições de manutenção dos aquários foram adaptadas de acordo com o livro: “*The Zebrafish Book*” (83) descrito resumidamente a seguir: água corrente tratada com AquaSafe (Tetra, Blacksburg, Virginia, Germany) de acordo com a instrução do fabricante. Este produto visa retirar o cloro e alguns metais pesados que possam ser encontrados na água. A temperatura da água foi mantida a 25°C e a qualidade foi determinada por pH:  $\pm 6,8$ , Alcalinidade: 50 – 100 mg/l de  $\text{CaCO}_3$ , Amônia < 0,02 mg/l e Nitrito < 0,1 mg/l. A limpeza foi realizada através de troca semanal do escoamento de 1/3 da água total do aquário e as paredes higienizadas com esponja. A condição de iluminação foi 14 horas de luz e 10 horas de escuro controlada por um temporizador e a alimentação foi realizada três vezes ao dia (às 8h da manhã: ração flocada; 12h: ovos de artêmia sem casca e 17h: ração flocada).

### **3.2. Indução da epilepsia no zebrafish com PTZ**

Por ocasião da experimentação, os animais adultos foram transferidos individualmente para um *becker* de vidro com volume final de 200ml contendo 15mM de PTZ (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) (animais experimentais) ou em *becker* com água sem PTZ (animais controle). A indução das crises epiléticas por PTZ possui três fases distintas, já descritas anteriormente em larvas (27). Este padrão foi usado para a análise do padrão em adulto.

### **3.3. Grupos experimentais e coleta dos encéfalos**

Crise única: os animais foram divididos em dois grupos: (i) PTZ – animais induzidos à crise epilética e (ii) CNT – animais controle sem crise epilética. A coleta dos encéfalos ocorreu nos tempos 0,05h (logo após a indução da crise epilética), 12h, 24h, 48h e 72h pós-indução de crise epilética e após os animais serem crióanestesiados. Cada tempo de investigação foi composto por um n=3 (seis encéfalos). Um *pool* de dois encéfalos foi usado para compor uma amostra de modo a se obter RNA total em quantidade suficiente para a análise dos transcritos dos genes de interesse.

Devido a heterogeneidade entre os animais, um segundo conjunto independente de animais também foi dividido em grupo PTZ e CNT (nomeado de experimento 2) e manipulados da mesma forma que o primeiro (nomeado de experimento 1). Portanto, neste estudo foram realizados dois conjuntos independentes para o mesmo tratamento e aquisição de encéfalos.

Crises repetitivas: foi estabelecido um único experimento com um protocolo de indução de crises diárias (1x dia) durante cinco dias consecutivos para o grupo PTZ. Os animais controle também foram manipulados sendo retirados de seu ambiente para um *becker* somente com água por igual período que o experimental. Neste protocolo, os encéfalos foram coletados uma semana após o quinto dia de exposição ao PTZ e cada grupo foi composto por um n=6 (12 encéfalos). É importante salientar que foi tomado o cuidado de excluir da casuística aqueles peixes que não apresentaram as três fases da criseepiléptica.

### **3.4. Análise molecular dos genes *bdnfe ntkr2***

#### **3.4.1. Protocolo de Extração do RNA Total**

A extração do RNA total do encéfalo de todos as animais foi realizada pelo método TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante (1ml do reagente para cada 100mg de tecido). A concentração do RNA total extraído de cada amostra foi medida por densidade óptica através da espectroscopia em equipamento NanoVue (*GE Healthcare, Buckinghamshire, UK*) e a qualidade do RNA checada por gel de eletroforese. Resumidamente:

Adicionou-se 500 µL de Trizol para cada 50-100mg de tecido macerado. Após a maceração, colocou-se os 500µL restantes (desta forma usou-se 1ml de Trizol para cada 100mg de tecido); incubou-se em temperatura ambiente por 5min; adicionou-seo clorofórmio (1/5 do volume de Trizol). Para 1ml = 200µl; agitou-se

otubovigorosamente por 15s com as mãos; incubou-se em temperatura ambiente por 2-3min; centrifugou-se por não mais do que 12000G por 15min (4°C); tranferiu-se a fase aquosa (~60% do volume de Trizol) para um novo tubo; adicionaram-se 500µL de álcool isopropílico para cada 1ml de Trizol, misturando o tubo por inversão; incubou-se por 10min em temperatura ambiente; centrifugou-se por não mais do que 12000G por 10min (4°C); descartou-se o sobrenadante por inversão do tubo, tomando o cuidado para não perder o *pellet*; adicionou-se 1ml de etanol 75% gelado; colocou-se no Vortex; centrifugou-se por não mais do que 7500G por 10min (4°C); descartou-se o sobrenadante por inversão do tubo. Com cuidado para não perder o *pellet*; em um papel absorvente deixou-se o tubo emborcado para baixo com tampa aberta para secar por cerca de 10 minutos; ressuspendeu-se em aproximadamente 20 µL de água DEPC.

### **3.4.2. Protocolo da RT (Transcriptase Reversa)**

Para a síntese de cDNA utilizou-se a enzima *SuperScript III* (Invitrogen) seguindo o protocolo: Adicionou-se 1µg de RNA; 0,5µL dNTP (mix 10mM); 0,5µL Random Primer (250ng) e; 5,0µL de água Milli Q; deixou-se por 5 minutos a 65°C e imediatamente após esse tempo, colocou-se no gelo por 1 minuto e meio; acrescentou-se 2µL de Buffer 5x; 0,5µL de DTT 0,1M e por fim 0,5µL da enzima *SuperScript III*; colocou-se em um termociclador com condição de ciclagem: 5 minutos a 25°C, 1 hora a 50°C, 15 minutos a 70°C e deixou-se resfriar até 4°C antes de retirar da máquina.

### **3.4.3. Protocolo da PCR em Tempo Real**

Para a análise dos transcritos dos genes *bdnf*, *ntkr2a* e *ntkr2b* foi utilizada a técnica da PCR quantitativa (qPCR) por meio do sistema TaqMan™ (*Applied Biosystems, Foster City*) em equipamento de Real Time 7500 (*Applied Biosystems, Foster City*). O sistema TaqMan é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. No caso desse estudo foram usadas sondas para os genes *bdnf*, *ntkr2a* e *ntkr2b* que foram marcadas com o fluoróforo FAM. Como controle endógeno foram selecionados os genes *18S* e *ef1a* para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. Os dois controles endógenos foram avaliados pelo programa *Data Assist™ Software v.3.01* (*Applied Biosystems, Foster City*), que se fundamenta nos princípios estabelecidos de Vandesompele e colaboradores (84) para a escolha do controle endógeno mais estável, ou seja, apresentam uma menor variação de expressão entre as amostras. Foi realizada a validação do sistema gene de interesse / controle endógeno, a fim de verificar se as eficiências de amplificação de ambos os genes são semelhantes e próximas a 100%. Para a quantificação relativa do gene selecionado, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicatas a partir de: 6,25µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix 2x*, 0,625µL da solução de *primer* e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA (50ng), sendo que no controle negativo, foi adicionado 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 pela análise dos resultados no programa

7500 System SDS Software (Applied Biosystems, Foster City). ) e pela quantificação relativa (QR) foi determinada pela equação  $QR = 2^{-\Delta\Delta C_t}$  (85).

#### **3.4.4. Análise estatística**

Para a análise de significância do perfil dos transcritos após crise aguda nos diferentes tempos foi empregado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Para a análise do transcrito após crises repetitivas foi empregado o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Foi considerado significativo um  $p \leq 0,05$ .

#### **3.5. Comitê de Ética**

Este projeto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNICAMP em 09 de agosto e 2010, protocolo 2222-1.

## 4. RESULTADOS

### ***4.1. Adequação dos cuidados e manutenção dos animais***

A quarentena (83) garantiu que peixes doentes não fossem utilizados, pois estes poderiam interferir nos resultados obtidos. Ainda em relação aos cuidados diários, foi estabelecida uma rotina na qual os peixes foram alimentados com comida flocada para adultos (TetraMin) duas vezes por dia (às 8h00 e às 17h00) de segunda à sexta-feira e, nos finais de semana, apenas uma vez. Além disso, introduzimos ovo sem casca de artêmia como suplementação alimentar uma vez ao dia (11h30), sete dias por semana. A limpeza dos aquários foi realizada uma vez por semana, com troca parcial da água. Os animais foram mantidos em ciclo claro (14 horas) e escuro (10 horas) e em água com pH entre 6,2 e 7,0 e com temperatura de 25°C. A limpeza dos filtros e os testes da água (pH e amônia) do aquário foram feitos uma vez por semana. Também foi estabelecida uma rotina de observação do comportamento dos peixes bem como da aparência exterior dos mesmos com o objetivo de isolar animais com comportamento alterado ou com sinais de enfermidades visíveis na pele ou nos olhos. Esses cuidados garantiram uma rápida intervenção e esse isolamento evitou que um número maior de animais fosse contaminado.

#### **4.2. Indução de crises por PTZ e obtenção do encéfalo**

Inicialmente foi realizado um estudo piloto para testar se a concentração usada nas larvas poderiam elicitar crises epilépticas também em animais adultos. Isso se fez necessário, pois no início deste trabalho não havia trabalhos que evidenciassem que concentrações de 15mM seria capaz de elicitar as três fases descritas por Baraban e colaboradores (27) em animais adultos. Uma solução contendo 15mM de PTZ em volume final de 200ml de água de aquário em temperatura 25°C foi preparada em um becker de vidro. Um peixe adulto foi colocado neste ambiente e observado se seu comportamento iria apresentar as três fases descritas por Baraban e colaboradores (27). Usamos três animais para o piloto com 15mM de PTZ e, como foi possível ver as três fases da crise, consideramos que esta também seria a concentração a ser usada em nossa experimentação com animais adultos. Ao serem expostos ao PTZ, os animais levam em torno de 2-3 minutos para apresentar todas as fases da crise epiléptica descritas no modelo.

#### **4.3. Extração de RNA total do encéfalo de zebrafish**

A concentração de RNA foi medida pelo espectrofotômetro NanoVue (GE – *General Electric*) e sua qualidade avaliada por meio da eletroforese em gel de agarose 10% (Figura 2).

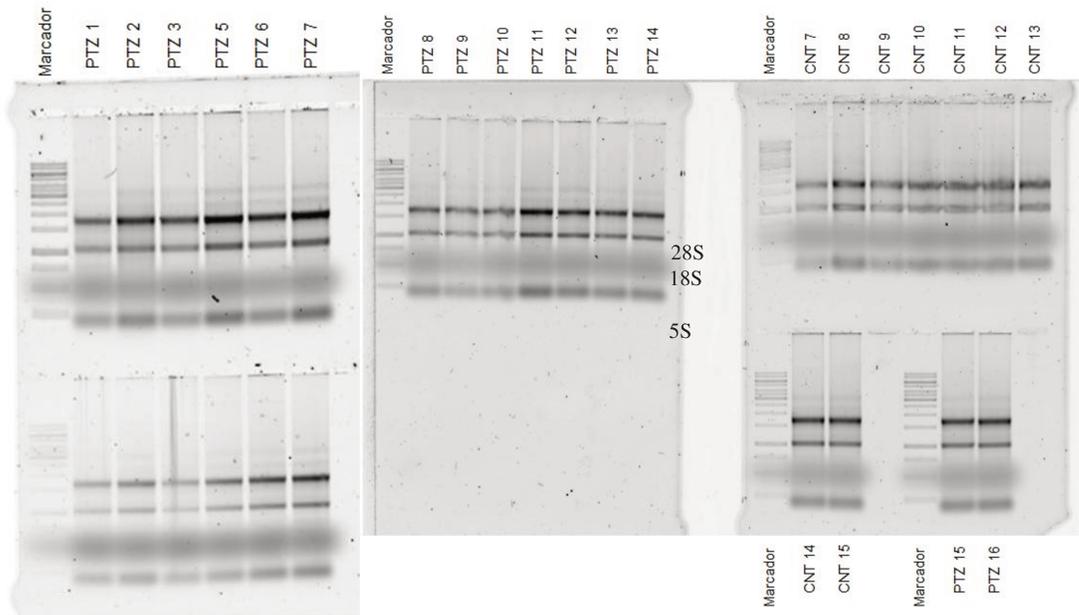


Figura 2—Imagem de gel de agarose para exemplificar a integridade do RNA total obtido a partir de tecido cerebral total de *zebrafish*. CNT - animal controle; PTZ - animal após crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol.

#### 4.4 RT-qPCR

Os controles endógenos foram avaliados e segundo o *DataAssist<sup>TM</sup> Software v.3.01 (AppliedBiosystems, Foster City)*, esses genes são eficientes para o estudo. Para verificar se as eficiências de amplificação dos genes *bdnf*, *ntrk2a*, *ntrk2b* e dos controles endógenos *18S eef1a* são próximas a 100% foi realizada uma validação destes genes. O melhor resultado obtido foi para a concentração de 2ng para todos os genes alvo e controles endógenos. Os resultados obtidos com a análise dos transcritos para cada gene e tempo de ambos os conjuntos de experimentação (experimento 1 e 2) para o endógeno *18S* estão resumidos nas Tabelas 1:

**Tabela 1 - Média da quantificação relativa (QR) dos genes *bdnf*, *ntrk2a* e *ntrk2b* para o controle endógeno *18S* nos diferentes tempos pós crise epiléptica induzida por PTZ.**

GENE	TEMPO	GRUPO	Experimento 1			Experimento 2			
			QR média	QR mín	QR máx	QR média	QR mín	QR máx	
<b><i>Bdnf</i></b>	0,05h	PTZ	0,832	0,007	0,013	2,993	1,922	3,034	
		CNT	0,214	0,02	0,037	0,795	0,172	0,205	
	12h	PTZ	0,289	0,148	0,089	0,792	0,383	0,310	
		CNT	0,307	0,031	0,044	0,409	0,110	0,206	
	24h	PTZ	0,487	0,29	0,292	1,042	0,550	0,569	
		CNT	0,256	0,048	0,045	0,704	0,146	0,178	
	48h	PTZ	0,808	0,428	0,298	0,734	0,314	0,174	
		CNT	0,320	0,166	0,233	0,438	0,015	0,027	
	72h	PTZ	0,266	0,055	0,091	0,252	0,130	0,254	
		CNT	0,263	0,075	0,057	0,264	0,155	0,157	
	<b><i>ntrk2a</i></b>	0,05h	PTZ	0,122	0,021	0,023	0,122	0,021	0,023
			CNT	0,220	0,089	0,048	0,220	0,089	0,048
		12h	PTZ	0,207	0,158	0,147	0,608	0,199	0,180
			CNT	0,475	0,047	0,071	0,360	0,090	0,173
24h		PTZ	0,138	0,104	0,071	1,316	0,700	0,601	
		CNT	0,138	0,081	0,125	0,849	0,355	0,252	
48h		PTZ	0,147	0,107	0,079	1,021	0,387	0,223	
		CNT	0,086	0,030	0,042	0,560	0,090	0,105	
72h		PTZ	0,123	0,012	0,019	0,204	0,117	0,232	
		CNT	0,239	0,070	0,110	0,217	0,128	0,183	
<b><i>ntrk2b</i></b>	0,05h	PTZ	0,243	0,107	0,066	0,122	0,021	0,023	
		CNT	0,253	0,055	0,106	0,220	0,089	0,048	

12h	PTZ	0,453	0,159	0,100	0,608	0,199	0,180
	CNT	0,577	0,056	0,062	0,360	0,090	0,173
24h	PTZ	0,575	0,337	0,382	1,316	0,700	0,601
	CNT	0,367	0,090	0,094	0,849	0,355	0,252
48h	PTZ	0,388	0,163	0,265	1,021	0,387	0,223
	CNT	0,232	0,120	0,166	0,560	0,090	0,105
72h	PTZ	0,360	0,058	0,052	0,204	0,117	0,232
	CNT	0,357	0,068	0,066	0,217	0,128	0,183

Na visualização gráfica destes resultados (Gráficos 1, 2 e 3) pode-se observar um *aumento* dos transcritos do gene *bdnf* no grupo PTZ em comparação ao grupo CNT no tempo 0,05h ( $p=0,017$ ) após as crises epilépticas, mas, se comparados com os receptores *ntrk2a* e *ntrk2b*, os mesmos não acompanham esse aumento. Nos tempos 12h, 24h e 48h não há diferença significativa entre o ligante e os receptores, mas existe uma tendência de aumento para o *bdnf* e o *ntrk2b*. Nenhuma diferença de aumento foi encontrada no tempo 72h entre ambos os grupos.

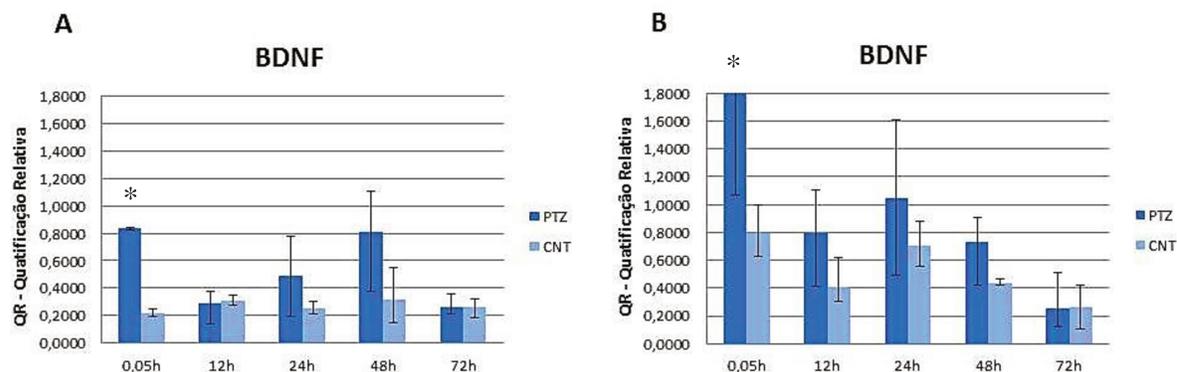


Gráfico 1 - Análise dos transcritos do gene *bdnf* em encéfalo de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol quando comparado com o grupo controle. Em A, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e em B, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *18S*. Valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.

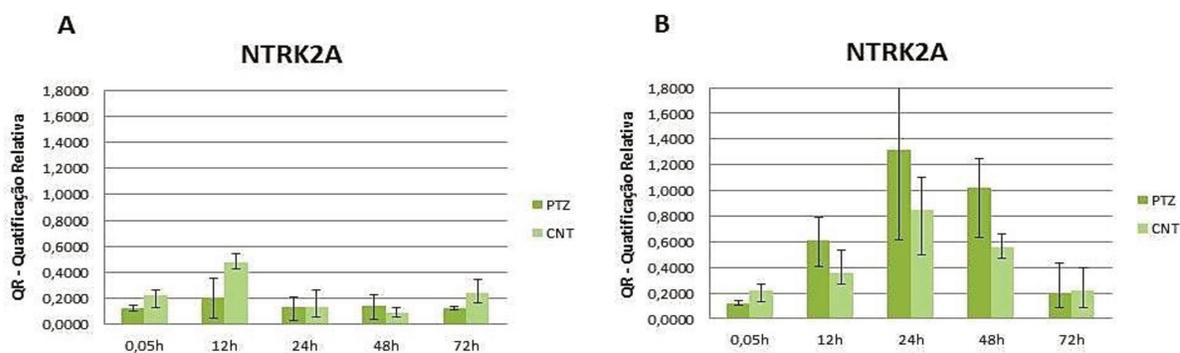
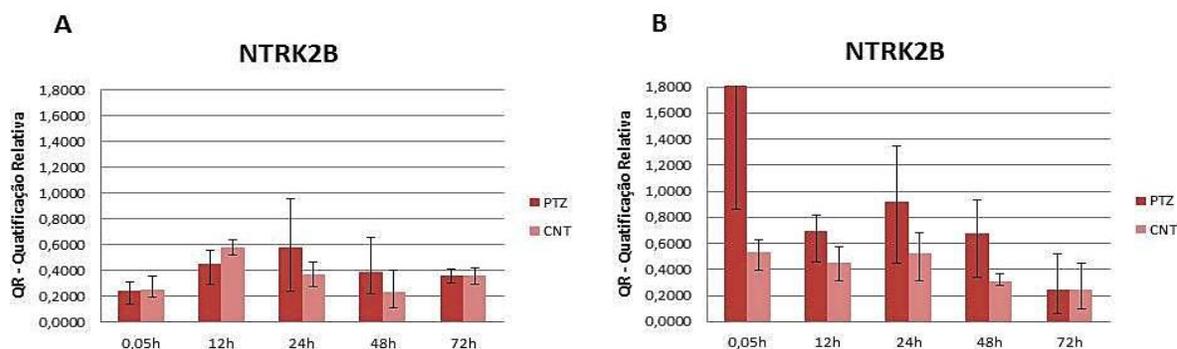


Gráfico 2 - Análise dos transcritos do gene *ntrk2a* em encéfalo de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol quando comparado com o grupo controle. Em A, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e em B, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *18S*. Valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.



**Gráfico 3 - Análise dos transcritos do gene *ntrk2b* em encéfalo de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol quando comparado com o grupo controle. Em A, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e em B, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *18S*. Valores representados pela Média ± Erro Padrão da Média.**

A comparação entre a relação ligante/receptor para os genes *bdnf*, *ntrk2a* e *ntrk2b* no grupo PTZ e no grupo CNT para o controle endógeno *18S*, pode ser visualizada nos gráficos 4 e 5. As barras verticais mostram o erro padrão das médias da quantificação relativa.

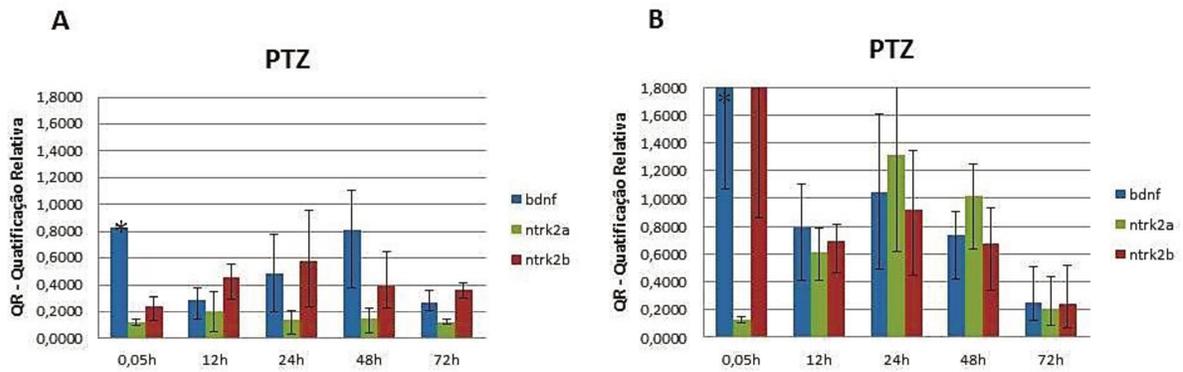


Gráfico 4 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crise epiléptica por pentilenotetrazol. Em A, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e em B, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *18S*. Valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.

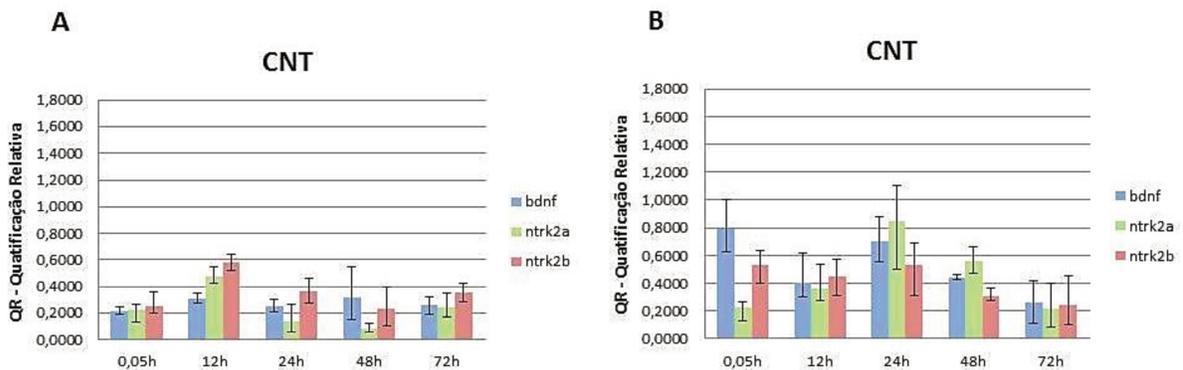


Gráfico 5 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crise epiléptica por pentilenotetrazol para o grupo controle. Em A, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e em B, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *18S*. Valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.

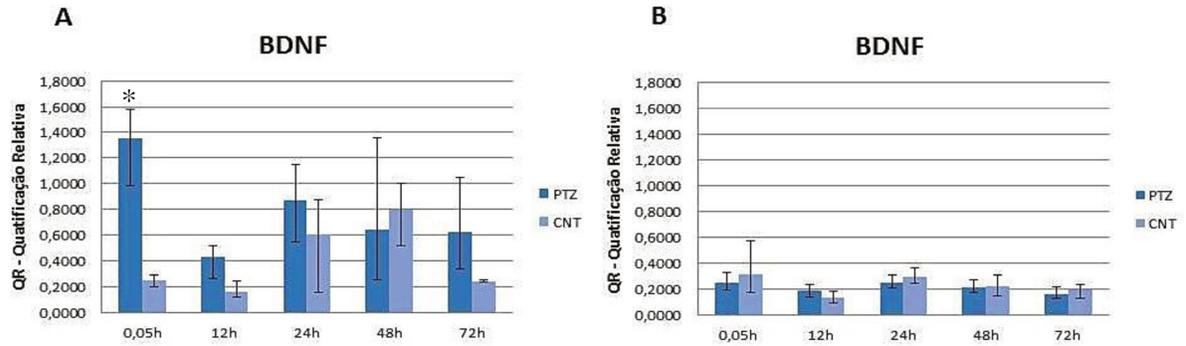
Os resultados obtidos com a análise dos transcritos para cada gene e tempo de ambos os conjuntos de experimentação (experimento 1 e 2) para o endógeno *EF1A* estão resumidos nas Tabelas 2:

**Tabela 2 - Média da quantificação relativa (QR) dos genes *bdnf*, *ntrk2a* e *ntrk2b* para o controle endógeno *ef1a* nos diferentes tempos pós crise epiléptica induzida por PTZ.**

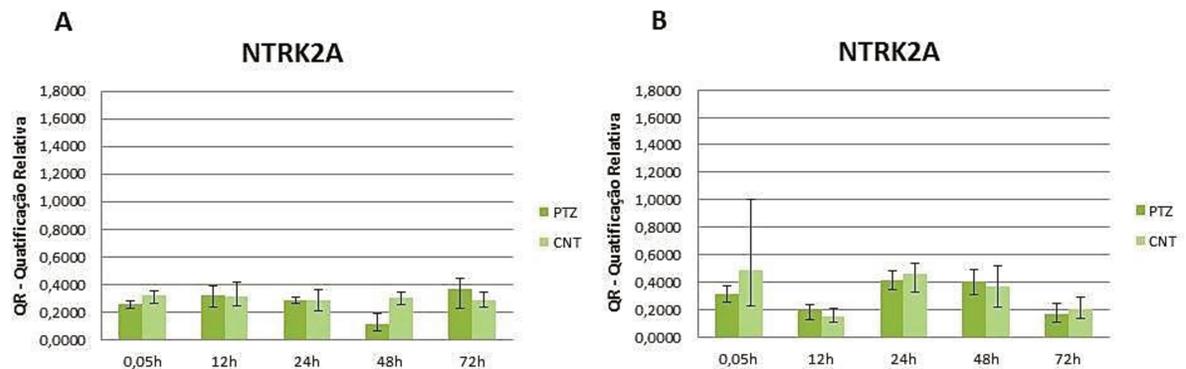
GENE	TEMPO	GRUPO	Experimento 1			Experimento 2			
			QR média	QR mín	QR máx	QR média	QR mín	QR máx	
<b><i>Bdnf</i></b>	0,05h	PTZ	1,352	0,369	0,229	0,251	0,062	0,072	
		CNT	0,247	0,049	0,047	0,312	0,143	0,256	
	12h	PTZ	0,429	0,168	0,087	0,183	0,050	0,053	
		CNT	0,158	0,044	0,085	0,131	0,038	0,054	
	24h	PTZ	0,871	0,323	0,274	0,248	0,041	0,060	
		CNT	0,604	0,447	0,270	0,296	0,049	0,066	
	48h	PTZ	0,639	0,385	0,724	0,217	0,043	0,056	
		CNT	0,800	0,280	0,200	0,218	0,070	0,088	
	72h	PTZ	0,628	0,292	0,417	0,163	0,037	0,052	
		CNT	0,243	0,009	0,011	0,193	0,069	0,041	
	<b><i>ntrk2a</i></b>	0,05h	PTZ	0,255	0,027	0,026	0,313	0,053	0,062
			CNT	0,322	0,058	0,033	0,490	0,263	0,510
12h		PTZ	0,327	0,092	0,068	0,198	0,072	0,042	
		CNT	0,313	0,072	0,101	0,154	0,047	0,059	
24h		PTZ	0,282	0,019	0,032	0,417	0,073	0,070	
		CNT	0,285	0,074	0,074	0,462	0,133	0,076	
48h		PTZ	0,113	0,049	0,081	0,405	0,093	0,091	
		CNT	0,301	0,048	0,040	0,373	0,157	0,151	

	72h	PTZ	0,367	0,143	0,081	0,167	0,054	0,078
		CNT	0,288	0,050	0,059	0,204	0,071	0,092
<b><i>ntrk2b</i></b>	0,05h	PTZ	0,302	0,185	0,125	0,165	0,093	0,105
		CNT	0,206	0,061	0,051	0,330	0,167	0,326
	12h	PTZ	0,522	0,224	0,243	0,126	0,056	0,035
		CNT	0,208	0,049	0,077	0,114	0,064	0,044
	24h	PTZ	0,747	0,316	0,249	0,159	0,024	0,026
		CNT	0,623	0,465	0,341	0,155	0,044	0,026
	48h	PTZ	0,595	0,551	1,091	0,138	0,021	0,026
		CNT	0,505	0,263	0,495	0,110	0,042	0,037
	72h	PTZ	0,604	0,287	0,263	0,106	0,049	0,052
		CNT	0,240	0,011	0,018	0,124	0,043	0,057

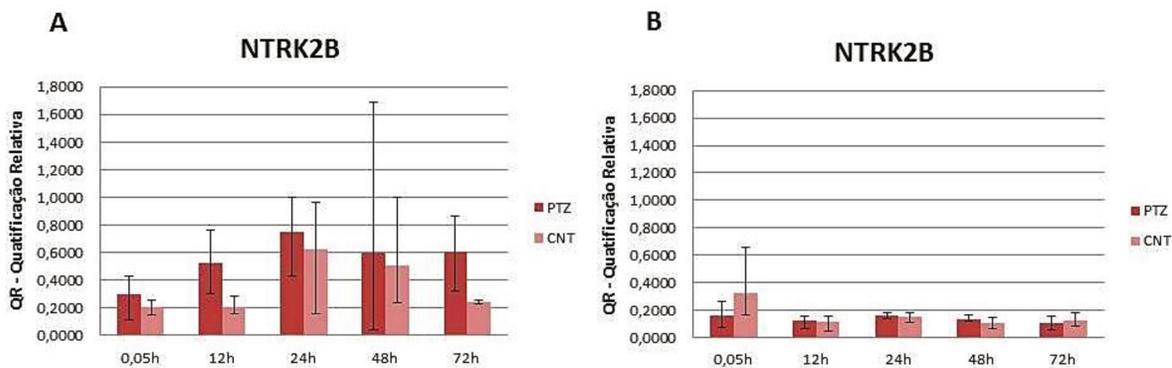
Os resultados obtidos com o controle endógeno *ef1a* não foram estatisticamente significativos ( $p > 0.05$  para todos os genes analisados), mas é possível identificar uma tendência de aumento do *bdnf* no tempo 0,05h. Pode-se observar que este aumento não foi acompanhado pelos receptores *ntrk2*. É possível observar que nos tempos 12h e 72h existe uma tendência de aumento no grupo PTZ em comparação com o grupo CNT para os genes *bdnf* e *ntrk2b*, mas para o receptor *ntrk2a* não há diferença. No entanto para os tempos de 24h e 48h não há diferença significativa para nenhum dos genes. Os gráficos 6, 7, 8, 9 e 10 nos mostram esses resultados.



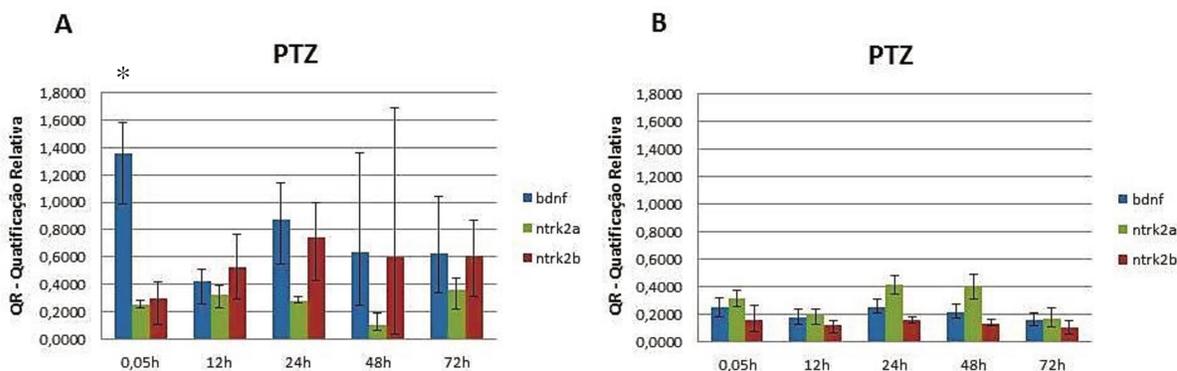
**Gráfico 6 - Análise dos transcritos do gene *bdnf* em encéfalo de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol quando comparado com o grupo controle. Em A, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e em B, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *EF1A*. Valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.**



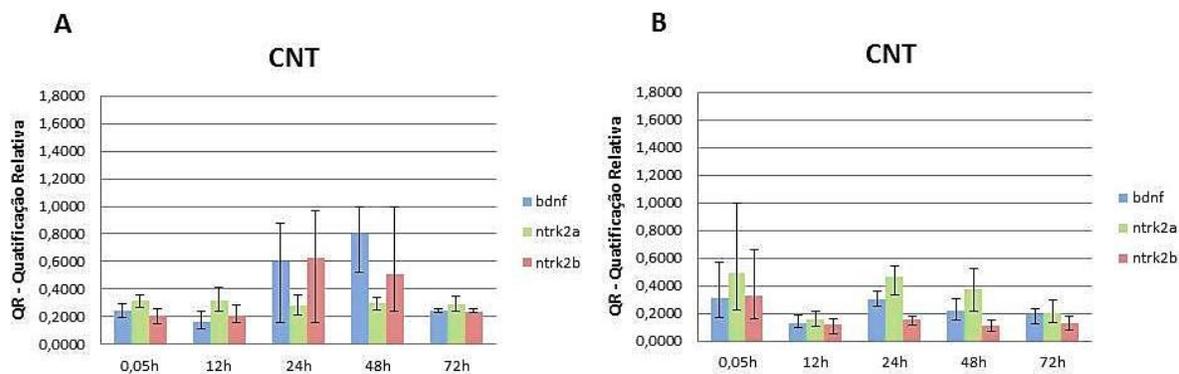
**Gráfico 7 - Análise dos transcritos do gene *ntrk2a* em encéfalo de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol quando comparado com o grupo controle. Em A, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e em B, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *EF1A*. Valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.**



**Gráfico 8 - Análise dos transcritos do gene *ntrk2b* em encéfalo de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por pentilenotetrazol quando comparado com o grupo controle. Em A, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e em B, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *EF1A*. Valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.**



**Gráfico 9 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crise epiléptica por pentilenotetrazol. Em A, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e em B, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *EF1A*. Valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.**



**Gráfico 10 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crise epiléptica por pentilenotetrazol para o grupo controle. Em A, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e em B, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *EF1A*. Valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.**

Para o protocolo de crises repetidas os valores obtidos usando-se o controle endógeno *18S* como normalizador foram: uma diminuição significativa para o gene *bdnf* do grupo PTZ em relação ao grupo CNT ( $RQ_{PTZ} = 0,03 \pm 0,01$ ,  $RQ_{CNT} = 0,47 \pm 0,08$ ) ( $p = 0,002$ ) e nenhuma diferença entre os seus receptores (*ntrk2a*:  $RQ_{PTZ} = 0,45 \pm 0,06$ ,  $RQ_{CNT} = 0,41 \pm 0,08$  e *ntrk2b*:  $RQ_{PTZ} = 0,59 \pm 0,05$ ,  $RQ_{CNT} = 0,49 \pm 0,05$ ), conforme pode ser visualizados nos gráficos de 11 a 15.

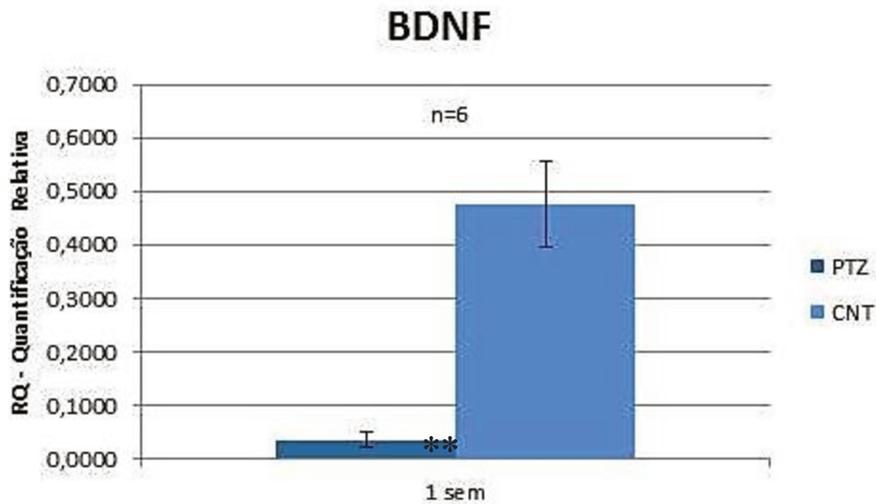


Gráfico 11 - Análise dos transcritos do gene *bdnf* em encéfalo de *zebrafish* após crises epilépticas repetidas induzidas por pentilenotetrazol (grupo PTZ) quando comparado com o grupo controle (CNT). O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *18S*. Valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média ( $p = 0,0022$ ).

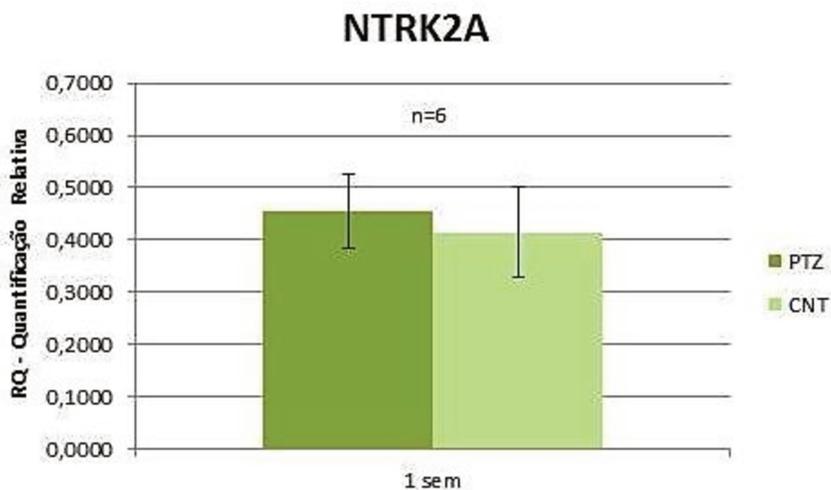


Gráfico 12 - Análise dos transcritos do gene *nrk2a* em encéfalo de *zebrafish* após crises epilépticas repetidas induzidas por pentilenotetrazol (grupo PTZ) quando comparado com o grupo controle (CNT). O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *18S*. Valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.

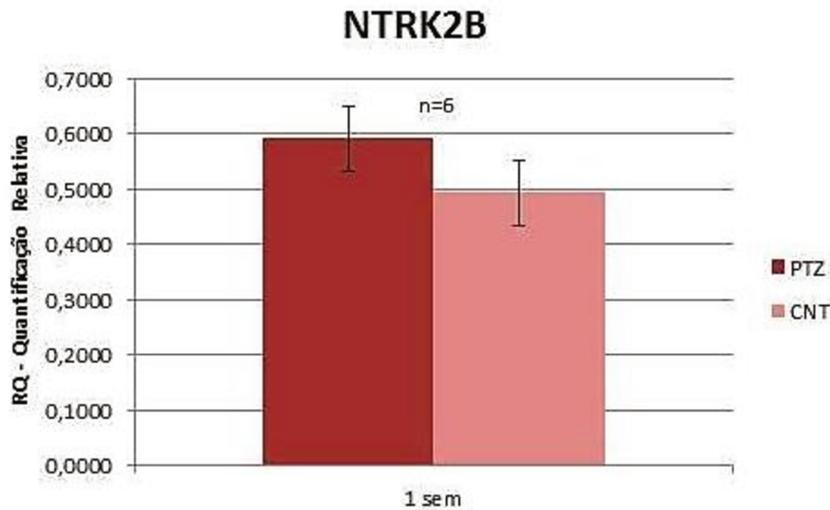


Gráfico 13 - Análise dos transcritos do gene *ntrk2b* em encéfalo de *zebrafish* após crises epiléticas repetidas induzidas por pentilenotetrazol (grupo PTZ) quando comparado com o grupo controle (CNT). O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *18S*. Valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.

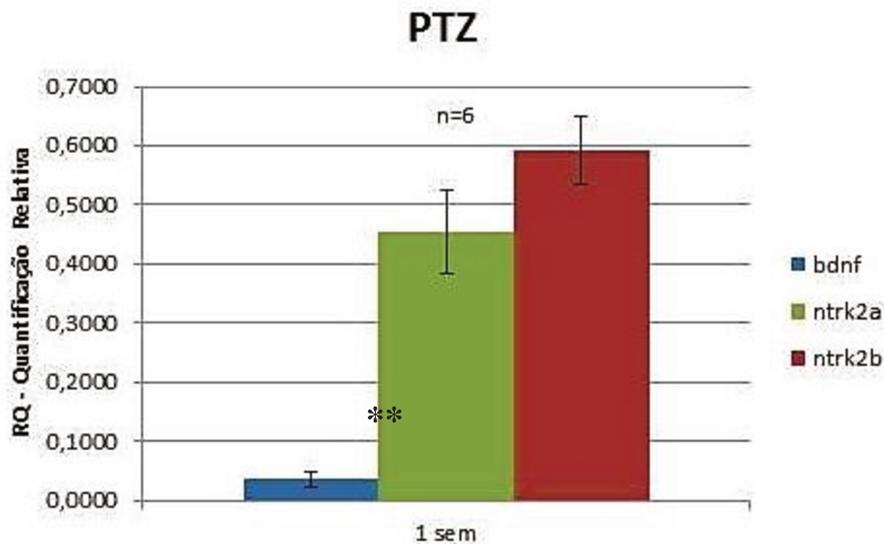
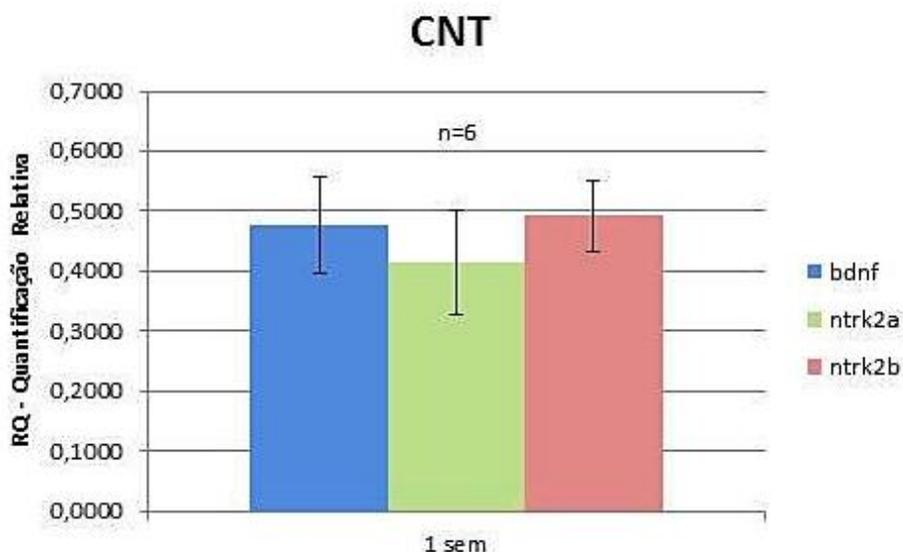


Gráfico 14 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crises epiléticas repetidas por pentilenotetrazol. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *18S*. Valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.



**Gráfico 15 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crises epiléticas repetidas por pentilenotetrazol para o grupo controle. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *18S*. Valores representados pela Média ± Erro Padrão da Média.**

Os resultados obtidos usando-se o gene *ef1a* como controle endógeno foram: *ntrk2a*:  $RQ_{PTZ} = 1,06 \pm 0,69$ ,  $RQ_{CNT} = 0,35 \pm 0,04$  e *ntrk2b*:  $RQ_{PTZ} = 0,87 \pm 0,61$ ,  $RQ_{CNT} = 0,26 \pm 0,04$ . Já para o gene *bdnf* o resultado mostrou uma tendência de diminuição ( $RQ_{PTZ} = 0,17 \pm 0,15$  e  $RQ_{CNT} = 0,34 \pm 0,07$ ). Nos gráficos 16, 17, 18, 19 e 20 os resultados podem ser observados. A barra vertical mostra o erro padrão da média da quantificação relativa.

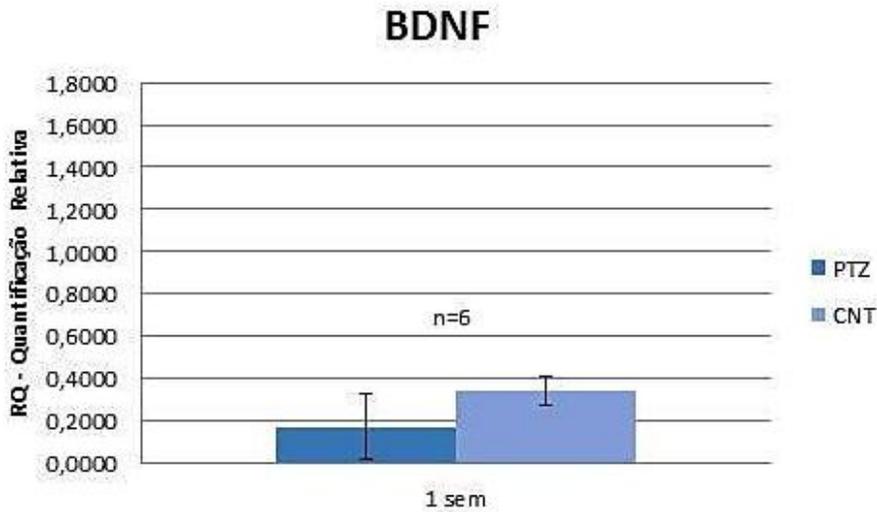


Gráfico 16 - Análise dos transcritos do gene *bdnf* em encéfalo de *zebrafish* após crises epilépticas repetidas induzidas por pentilenotetrazol (grupo PTZ) quando comparado com o grupo controle (CNT). O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *ef1a*. Valores representados pela Média ± Erro Padrão da Média.

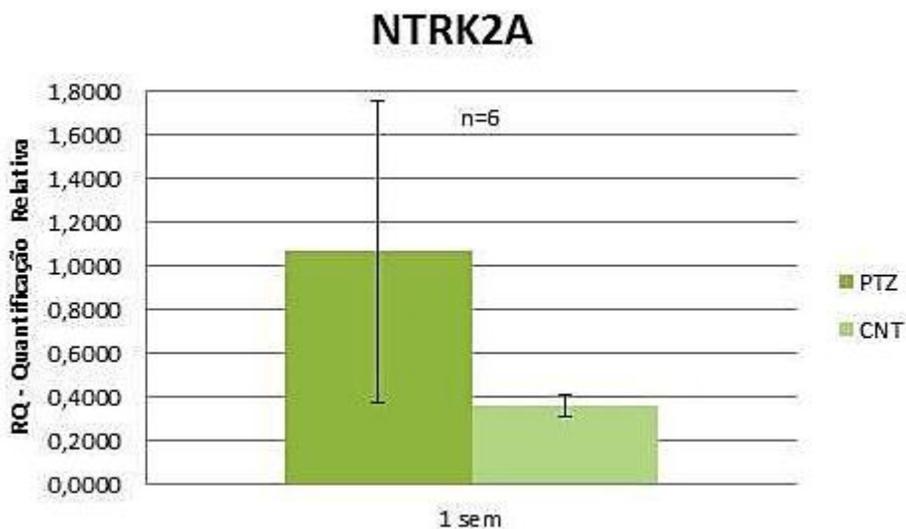
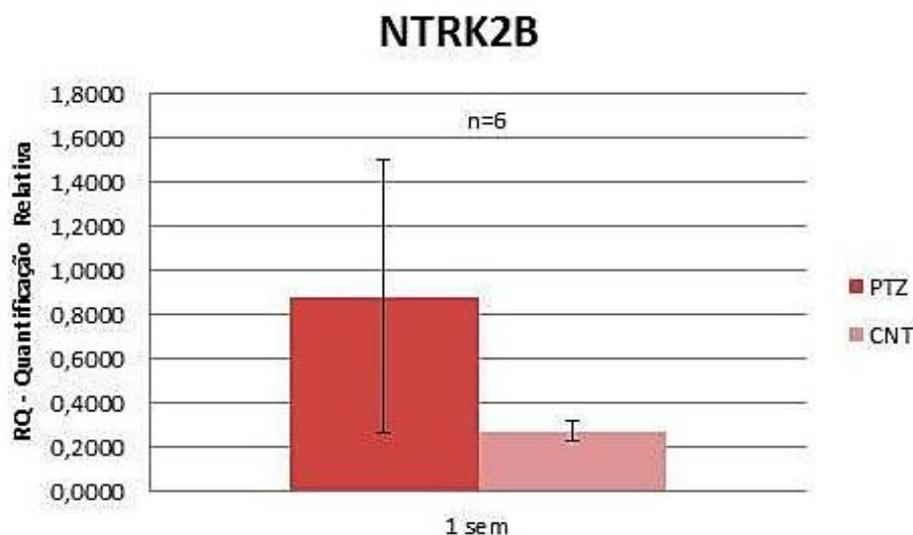
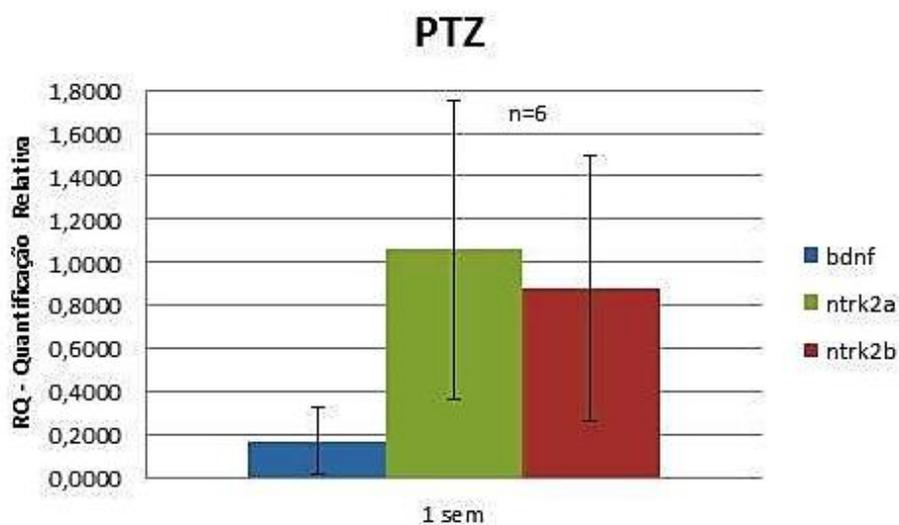


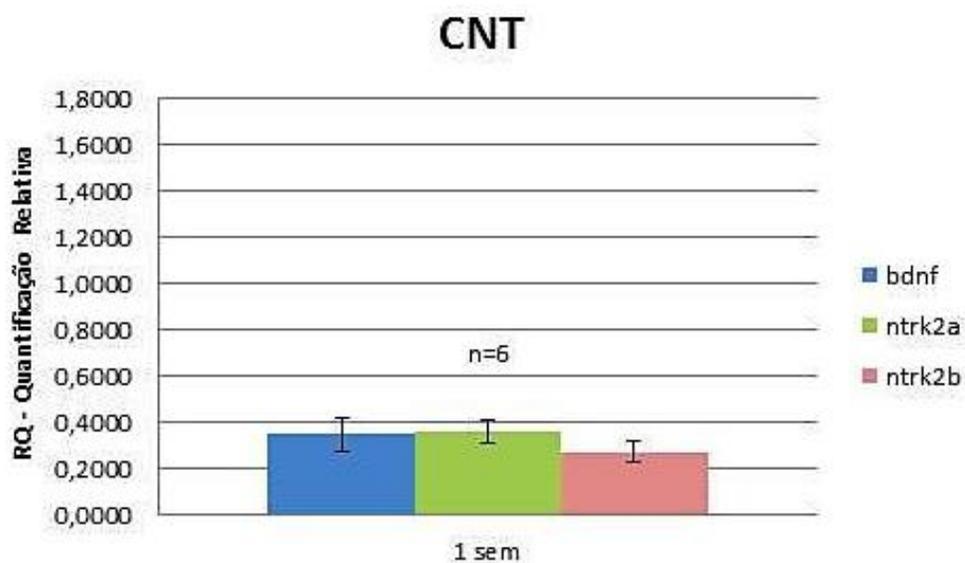
Gráfico 17 - Análise dos transcritos do gene *nrk2a* em encéfalo de *zebrafish* após crises epilépticas repetidas induzidas por pentilenotetrazol (grupo PTZ) quando comparado com o grupo controle (CNT). O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *ef1a*. Valores representados pela Média ± Erro Padrão da Média.



**Gráfico 18 - Análise dos transcritos do gene *ntrk2b* em encéfalo de *zebrafish* após crises epilépticas repetidas induzidas por pentilenotetrazol (grupo PTZ) quando comparado com o grupo controle (CNT). O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *ef1a*. Valores representados pela Média ± Erro Padrão da Média.**



**Gráfico 19 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crises epilépticas repetidas por pentilenotetrazol. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *ef1a*. Valores representados pela Média ± Erro Padrão da Média.**



**Gráfico 20 - Relação entre os níveis de transcritos do ligante/receptor no encéfalo de *zebrafish* adulto após indução de crises epilépticas repetidas por pentilenotetrazol para o grupo controle. O gene alvo foi normalizado com o controle endógeno *ef1a*. Valores representados pela Média ± Erro Padrão da Média.**



## 5. DISCUSSÃO

O *zebrafish* é um modelo animal que apresenta muitas vantagens ao ser utilizado como modelo experimental tem sido reconhecido para estudos de doenças humanas, incluindo as relacionadas ao SNC, como as epilepsias (27, 86, 87).

Neste estudo foram estabelecidas as condições ideais de manutenção e cuidados dos animais para o nosso ambiente de laboratório. As condições adequadas para o Laboratório de Zebrafish (LabZeb) foram aquelas descritas na seção de métodos. Resumidamente: foi mantida uma densidade de 3 peixes por litro de água, com sifonagem (retirada de dejetos liberados pelos animais) realizada uma vez por dia, a limpeza das paredes dos aquários é realizada uma vez por semana, juntamente com a troca de 1/3 da água. A amônia é controlada com essa troca da água e o auxílio de bactérias que transformam o nitrato em nitrito. O controle do pH é feito com teste próprio para aquário e mantido entre 6,6 e 7,0. E, para manter o pH nessa faixa, utilizamos um tipo de pedra de jardim chamada dolomita que ajuda a aumentar o pH (83). A alimentação dos peixes é realizada três vezes por dia: de manhã e fim da tarde com ração flocada TetraMin e na hora do almoço com ovos de artêmia sem casca. Ter uma alimentação com artêmia é muito importante para os filhotes e para os peixes que estão se reproduzindo, pois, principalmente as fêmeas necessitam de mais proteína para a produção dos ovos. A temperatura ideal para manter o aquário é entre 26°C e 28°C. Mas Hunt e

colaboradores em um artigo de 2012 descreveram que larvas podem ter uma atividade neuronal aumentada a partir de  $25,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$ . Como esse nosso estudo envolve crise epiléptica optamos por manter os aquários com no máximo  $25^\circ\text{C}$  (44).

Em 2005, Baraban e colaboradores mostraram que larvas de 7 dpf apresentam padrões eletrográficos, comportamentais e moleculares muito similares aos vistos em outros modelos de epilepsia. As três fases do comportamento descritas neste estudo foram usadas como parâmetro para induzirmos crises epiléticas em animais adultos em nosso laboratório, visto que no início deste estudo nada havia sido publicado a respeito. Os peixes adultos expostos ao PTZ na concentração de 15mM apresentam as mesmas três fases descritas por Baraban *et al.* (27), mas com um diferencial: o de ser possível analisar mais detalhadamente o que ocorre nessas diversas fases. A crise começa com o aumento da atividade do nado, giros de  $180^\circ$  de um lado para o outro com a aceleração da respiração; desta fase pode-se notar que os movimentos tornam-se mais vigorosos com movimentos circulares e verticais evoluindo para breves movimentos similares a uma crise tônico-clônica com posterior perda de postura. Alguns peixes apresentaram hiperemia após alguns segundos expostos ao PTZ. Isso pode ter ocorrido por causa de uma maior circulação sanguínea (88). Portanto, o peixe adulto apresenta crise epilética muito similar a das larvas descrita previamente (27).

A sinalização BDNF/ NTKRB tem sido implicada na epileptogênese (89), assim como o aumento dos níveis de RNAm e protéicos destas neurotrofinas após

crise epiléptica tem sido descrito em diferentes modelos animais (90). No entanto, o impacto de crises epilépticas sobre o perfil de transcritos dos genes *bdnf* e *ntkr2* no cérebro do *zebrafish* ainda não é conhecido. Porque o gene *ntkr2* é duplicado no *zebrafish*, neste estudo foram investigados ambos os genes, *ntkr2a* e *ntkr2b*, pois os mesmos poderiam apresentar diferentes padrões de expressão (40, 45, 46).

Em modelo animal de ratos com administração intracerebroventricular de ácido caínico, no 4º. dia pós-injeção, houve um aumento de 179% dos níveis de BDNF no hipocampo quando comparado com um hipocampo controle. Esse valor tende a diminuir com 45 dias (98%) e 120 dias (37%) após a administração do ácido caínico (91). Em outro estudo, Garcia e colaboradores (61), também usando o modelo de ácido caínico em ratos, demonstraram por meio de hibridização *in situ*, um aumento do BDNF principalmente nas áreas CA1 e CA3 uma semana após a injeção deste agente convulsivante (61). Distribuído amplamente no cérebro de roedores adultos, o BDNF, apresenta níveis mais altos em estruturas associadas com a epilepsia e a plasticidade sináptica, como a formação hipocampal (47). O fator de crescimento BDNF também é tido como molécula-chave no processo epileptogênico, já que participa diretamente da formação normal e aberrante das fibras musgosas e é normalmente encontrado com expressão elevada em modelos animais de epilepsia e em humanos (73).

O aumento estimulado por crise epiléptica com retorno escalonado até aos níveis basais, também pode ser visto no perfil obtido em nosso estudo, ainda que o tempo de ocorrência seja diferente, revelando-se muito mais precoce no caso do

peixe (gráficos 1, 2, 3 e 7). É ainda relevante notar que o padrão de resposta do RNAm do *bdnf* tenha sido tão intenso no tempo 0,05h ( $p=0,01$ ), evidenciando uma clara diferença no tempo diferente de resposta entre *bdnf* e os receptores *ntkr2* no *zebrafish*.

Apesar de haver discordância sobre o real papel do BDNF nas epilepsias, estudos da ação endógena (70) e exógena (71) do BDNF sugerem que o mesmo tenha um papel protetor. O aumento da síntese de BDNF desencadeada por insultos em certas populações neuronais também parece ser uma resposta protetora, em uma tentativa de impedir a morte neuronal (72).

Por outro lado, o BDNF parece ter também um papel na excitabilidade, pois quando NT-3 e BDNF são aplicados em cultura de neurônios hipocâmpais promovendo aumento do cálcio intracelular e rapidamente um aumento da atividade sináptica (75, 76).

Em relação aos receptores, existem dois receptores diferentes para o BDNF: o *ntkr2* e o *p75*, sendo que cada receptor atua em uma via de sinalização gerando uma resposta celular diferente, como descrito na figura 3.

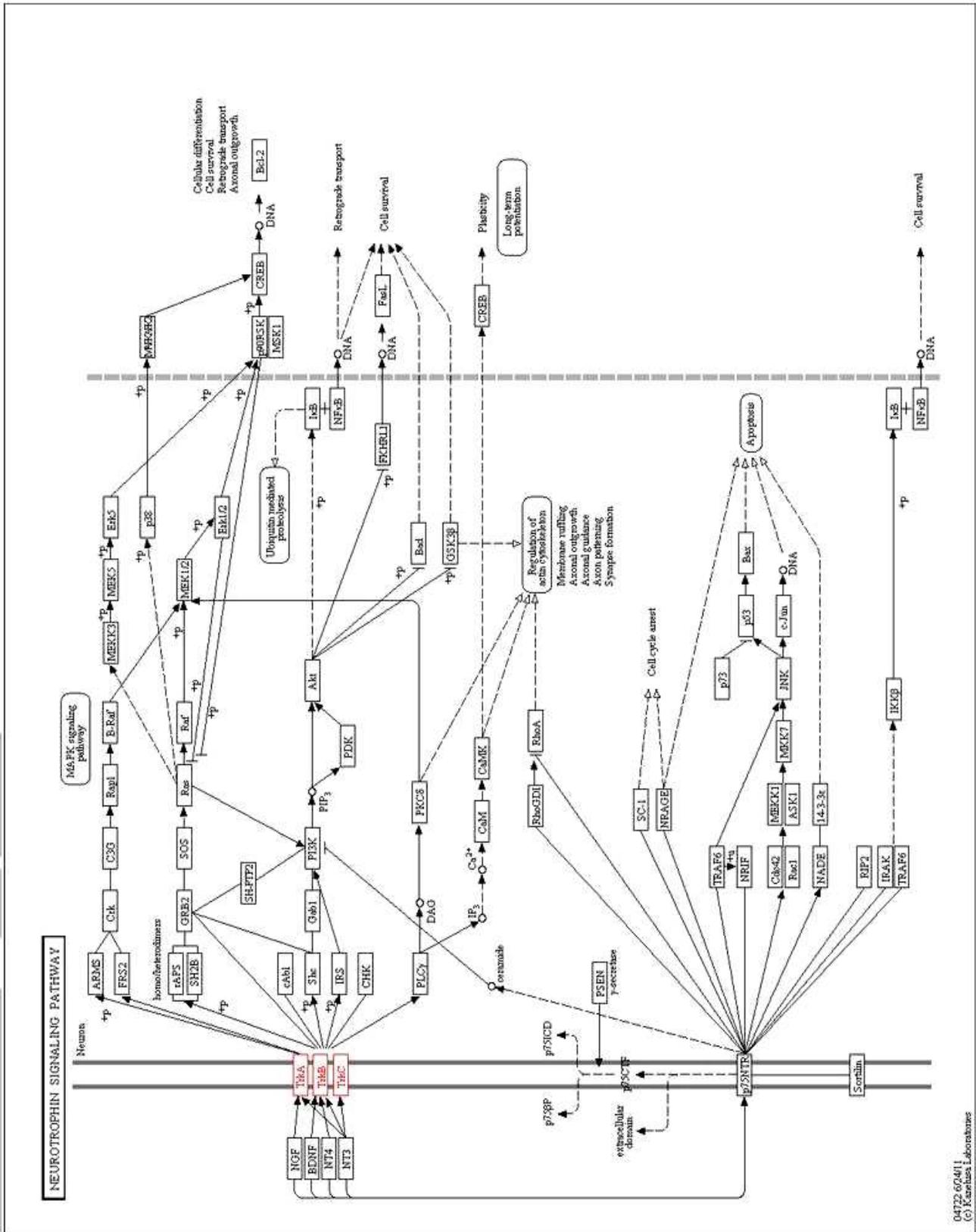


Figura 3—Figura da via de sinalização do *bdnf*, retirada de [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map04722](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map04722)

O BDNF quando se liga ao receptor *NTRK2* gera vias de sinalização de diferenciação celular, sobrevivência celular e plasticidade, prevenindo a apoptose (82). No entanto, sabe-se que a cascata de sinalização promovida pela ligação do BDNF ao seu outro receptor, *p75*, desencadeia principalmente uma via de sinalização de apoptose, mas é importante destacar que esse mesmo receptor pode também desencadear uma via de sobrevivência celular (50). Nesse estudo, nós não investigamos o gene *p75*; no entanto, está descrito que este pode estar aumentado logo após a indução de crises, como visto no modelo de *status epilepticus* com o uso da pilocarpina em rato. Neste modelo de pilocarpina, a expressão proteica do *p75* encontra-se aumentada no hipocampo logo após a indução da crise permanecendo assim até o 7º dia (com o seu maior pico no 3º dia) e diminuindo consideravelmente após o 14º dia de indução (92). Roux e colaboradores (92) investigaram a morte neuronal por meio da técnica de TUNEL e mostraram que nesse mesmo período de elevada expressão do *p75* existe também um elevado grau de morte neuronal. Em um outro estudo, após indução de crises com pilocarpina, em camundongos *knockout* para o receptor *p75* houve uma redução de 80% da morte neuronal se comparados com os camundongos do tipo selvagem (93). Portanto, apesar do *p75* também estar relacionado com a via de sinalização de sobrevivência celular, ele parece estar mais envolvido com a sinalização de apoptose. Apesar da forma madura do BDNF ter baixa afinidade pelo receptor *p75*, esta poderia ser uma via de ação para o *bdnf* neste tempo 0,05h (94), mostrando um padrão mais complexo de interação entre neurotrofinas e seus receptores (95).

Em nosso estudo nos tempos 12h, 24h e 48h após a crise epilética não encontramos diferença significativa entre o ligante e os receptores, mas existe uma tendência de aumento para o gene *bdnf* e o gene *ntkr2b* no grupo PTZ comparando com o grupo CNT. Essa relação entre ligante e receptor pode estar desencadeando vias de sinalização de diferenciação e sobrevivência celular e plasticidade (72). Nenhuma diferença de aumento foi encontrada no tempo 72h entre ambos os grupos.

É importante ressaltar que apesar do número de amostras ser representativo (06 encéfalos por tempo em cada experimento independente) é possível observar que há variação (representada pelas barras de erros gráficos 1-4, 6, 8 e 9) entre as amostras do mesmo grupo e tempo. Este fator poderia ser o motivo das diferenças não terem sido estatisticamente significantes, apesar do visível aumento dado pelos valores da média da quantificação relativa (tabelas 1 e 2). Desta forma, poderíamos chamar a atenção e destacar que estudos envolvendo animais adultos fornecidos comercialmente devem ter um tamanho amostral suficiente para minimizar a grande variação individual.

Em nosso estudo, usamos dois controles endógenos para a normalização da RT-qPCR, ambos considerados estáveis dentre nove genes analisados para controle endógeno em tecidos de *zebrafish* (96, 97) e também pelo *DataAssist<sup>TM</sup> Software v.3.01 (Applied Biosystems, Foster City)*. Além disso, realizamos uma segunda bateria de experimentos (experimento 2) com um grupo independente de animais, que confirmaram os resultados obtidos previamente. Por causa dessa variação, consideramos os dados que foram iguais em pelo menos três, dos

quatro resultados obtidos (experimentos 1 e 2 para ambos os controles endógenos). As pequenas diferenças entre o experimento 1 e 2 se devem, provavelmente ao fato dos peixes serem de épocas de quarentenas diferentes.

No protocolo de crises epiléticas repetidas, os nossos resultados apontam uma diminuição do *bdnf* no grupo PTZ quando comparado com o grupo CNT (gráficos 11 e 16). O tempo analisado foi de uma semana após o término da indução com o PTZ. Ao contrário dos nossos resultados, crises por abrasamento aumentam os níveis de BDNF no hipocampo de ratos dois dias após a indução das crises epiléticas e só diminuem quando há administração da NT-3 nos hipocampos abrasados eletricamente e nos controles (98). Após crises por abrasamento há um aumento transitório do RNAm e proteínas dos receptores da família *Trk* no hipocampo (99). Os nossos resultados com o protocolo de crises epiléticas repetidas também apontam, para uma tendência de aumento desses mesmos transcritos. A diminuição do gene *bdnf* associado com o aumento dos receptores *trkb*, podem estar também representando uma resposta ao estresse de manipulação diária ao qual o animal foi submetido. Em roedores, foi demonstrado que o estresse crônico aumentou o RNAm dos receptores *TrkB* e diminuiu o RNAm do BDNF (100).

Este estudo não teve a intenção de responder qualquer controvérsia em relação ao papel das neurotrofinas na epileptogênese, mas sim, verificar se a indução de crise epilética poderia alterar os níveis de transcrito do *bdnf* e seus receptores *ntkr2* no encéfalo do *zebrafish* adulto, como é visto em outros modelos animais. Nossos resultados mostraram que embora temporalmente mais curto, o

*zebrafish* apresenta uma elevação dos níveis do *bdnf* como visto em outros modelos de epilepsia, mas com um pico de expressão no tempo 0,05h (61, 91). Em relação ao protocolo de crises repetidas, novos estudos são necessários para esclarecer e explorar essa diferença de níveis de transcrito dos genes *bdnf* e *ntrk2*. Sabemos que outras investigações serão necessárias a fim de se gerar um maior conhecimento sobre as respostas das NTs a insultos, como as crises epiléticas únicas ou repetitivas. Investigações como análise do receptor p75, localização morfológica das alterações de expressão das neurotrofinas no encéfalo do *zebrafish* adulto ou até mesmo imaturo, são algumas das abordagens que precisam ser realizadas. Outra abordagem que já está em andamento em nosso laboratório é a investigação de morte neuronal como consequência das crises epiléticas induzidas por PTZ. Um estudo piloto aponta para um pequeno aumento no número de células neuronais marcadas por Fluoro-Jade B (um marcador específico de células neuronais em degeneração) no encéfalo dos animais adultos que foram expostos ao PTZ e que foram analisados por esta histoquímica após 24h da crise epilética. Neste sentido, faz-se importante analisar o receptor *p75* e outros genes da via de indução de apoptose para corroborar ou não a hipótese de que imediatamente após a crise, o *bdnf* poderia estar agindo via receptor *p75* na sinalização de apoptose.

Os estudos da expressão de transcritos em diferentes tempos pós-crise epilética e pós crises repetidas nunca foram descritos no modelo do *zebrafish*, portanto o nosso estudo é o primeiro que visa entender o padrão temporal de

expressão do *bdnf* e seus receptores neste modelo, para então buscarmos compreender qual o papel das neurotrofinas na epilepsia.

## 6. CONCLUSÕES

1. A indução de crise epiléptica pelo agente PTZ na concentração 15mM em animais adultos mostrou que o padrão comportamental nesses animais foi similar ao comportamento das larvas descrito por Baraban e colaboradores (27), sendo que os animais apresentaram o comportamento completo em um período de 2-3 minutos após entrarem em contato com o agente convulsivante;
  
2. O perfil de transcrito dos genes *bdnf* e *ntkr2* em diferentes tempos após a indução de crise epiléptica por PTZ mostrou:
  - 2.1. Um aumento do transcrito do gene *bdnf* imediatamente após o insulto que não foi acompanhado pelos seus receptores *ntkr2*;
  
  - 2.2. Um aumento de expressão nos tempos 24 e 48h após a indução da crise epiléptica;
  
  - 2.3. O perfil descrito neste estudo é similar ao encontrado para os modelos de roedores, no entanto, a relação entre o gene *bdnf* no tempo 0,05h e seu receptor *ntkr2* foi diferenciada e não é descrita em outros modelos

3. O perfil de transcrito dos genes *bdnf* e *ntkr2* no protocolo de indução de crises epilépticas repetitivas mostrou uma diminuição do transcrito do gene *bdnf* no grupo PTZ em comparação com o grupo CNT.

4. Este é o primeiro estudo que descreve as alterações dos transcritos das NT no encéfalo do *zebrafish* adulto após a indução de crises epilépticas únicas e repetitivas e contribui para uma melhor caracterização deste modelo nos estudos das epilepsias.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Hauser WA, Annegers JF and Rocca WA. **Descriptive Epidemiology of Epilepsy: Contributions of Population-Based Studies From Rochester, Minnesota.** Mayo Clinic Proceedings, 1996; 71: 576-786.
2. Annegers JF, Rocca WA and Hauser WA. **Causes of Epilepsy: Contributions of the Rochester Epidemiology Project.** Mayo Clinic Proceedings, 1996; 71: 570-575.
3. Hauser WA, Annegers JF and Kurland LT. **Incidence of Epilepsy and Unprovoked Seizures in Rochester, Minnesota: 1993-1984.** Epilepsia, 1993; 34(3): 453-468.
4. Borges MA, Min LL, Guerreiro CAM, Yacubian EMT, Cordeiro JA, Tognola WA, Borges APP and Zanetta DM. **Populational Study in São José do Rio Preto, a Medium-sized City in Brazil.** Arquivos de Neuropsiquiatria, 2004; 62(2-A): 199-205.
5. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross H, Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P and Scheffer IE. **Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009.** Epilepsia, 2010; 51(4): 676–685.
6. Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes F and Lopes-Cendes I. **Considerações Gerais.** Epilepsia. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 419 páginas.

7. Garcia MEG, Morales IG and Guiu JM. **Experimental Models in Epilepsy.** Neurologia, 2010; 25(3): 181-188.
8. Kobayashi E, Lopes-Cendes I, Guerreiro CAM, Sousa SC, Guerreiro MM and Cendes F. **Seizure Outcome and Hippocampal Atrophy in Familial Mesial Temporal Lobe Epilepsy.** Neurology, 2001; 56(2): 166-172.
9. Bourgeois BFD. **Temporal Lobe Epilepsy models for localization-related epilepsies.** Italian Journal of Neurological Sciences, 1995; 16: 9-16.
10. Maurer-Morelli CV, Secolin R, Morita ME, Domingues RR, Marchesini RB, Santos NF, Kobayashi E, Cendes F and Lopes-Cendes I. **A Locus Identified on Chromosome 18P11.31 is Associated with Hippocampal Abnormalities in a Family with Mesial Temporal Lobe Epilepsy.** Frontiers in Neurology, 2012; 3: 124.
11. Cendes F, Andermann F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, Watson C, Melanson D, Olivier A, Peters T, Lopes-Cendes I, Leroux G. **MRI volumetric measurement of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy.** Neurology, 1993; 43:719-725.
12. Van Paesschen W, Revesz T, Duncan JS, King MD, Connelly A. **Quantitative neuropathology and quantitative magnetic resonance imaging of the hippocampus in temporal lobe epilepsy.** Annals of Neurology, 1997; 42: 756-766.
13. Houser CR. **Granule Cell dispersion in the Dentate Gyrus of Humans with Temporal Lobe Epilepsy.** Brain Research, 1990; 535: 195-204.
14. Engel JJr and Pedley TA. **Epilepsy: A Comprehensive Textbook (volume one).** Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. 1097 páginas.

15. Blümcke I, Beck H, Lie AA and Wiestler OD. **Molecular Neuropathology of Human Mesial Temporal Lobe Epilepsy.** Epilepsy Research, 1999; 36: 205-223.
16. Michelucci R, Pasini E and Nobile C. **Lateral Temporal Lobe epilepsies: Clinical and Genetics Features.** Epilepsia, 2009; 50(5): 52-54.
17. Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli-Boneschi F, Choi C, Morozov P, Das K, Teplitskaya E, Yu A, Cayanis E, Penchaszadeh G, Kottmann AH, Pedley TA, Hauser WA, Ottman R and Gilliam TC. **Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features.** Nature Genetics, 2002; 30(3): 335-341.
18. Poza JJ, Saenz A, Martinez-Gil A, Cheron N, Cobo AM, Urtasun M, Martí-Massó JF, Grid D, Beckmann JS, Prud'homme JF and López de Munain A. **Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical and genetic study of a large Basque pedigree linked to chromosome 10q.** Annals of Neurology, 1999; 45(2): 182-188.
19. Leite JP, Bortolotto ZA and Cavalheiro EA. **Spontaneous Recurrent Seizures in Rats: An Experimental Model of Partial Epilepsy.** Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 1990; 14: 511-517.
20. Shin EJ, Jeong JH, Chung YH, Kim TW, Shin CY, Kim WK, Ko KH and Kim HC. **Decrease in the Kainate-induced Wet Dog Shake Behavior in Genetically Epilepsy-prone Rats: Possible Involvement of an Impaired Synaptic Transmission to the 5-HT (2A) Receptor.** Journal of Pharmacological Science, 2009; 110(3): 401-404.

21. Tsuchiya K and Kogure S. **Fast Fourier Transformation Analysis of Kindling-induced Afterdischarge in the Rabbit Hippocampus.** *Epilepsy Research*, 2011; 95 (1-2): 144-151.
22. Xiong W, Ping X, Gao J and Jin X. **Preparing Undercut Model of Posttraumatic Epileptogenesis in Rodents.** *Journal of Visualized Experiments*, 2011; (55). pii: 2840. doi: 10.3791/2840.
23. Engel JJr. **Critical evaluation of animal models for localization-related epilepsies.** *Italian Journal of Neurological Science*, 1995; 16(1-2): 9-16.
24. Leite JP and Terra-Bustamante VC. **Plasticidade Cerebral e Epileptogênese.** *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 1999; 9: 10-14.
25. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z and Turski L. **Limbic Seizures Produced by Pilocarpine in Rats: Behavioural, Electroencephalographic and Neuropathological Study.** *Behavioural Brain Research*, 1983; 9: 315-335.
26. Cavalheiro EA. **The pilocarpine model of epilepsy.** *Italian Journal of Neurological Science*, 1995; 16(1-2): 33-37.
27. Baraban SC, Taylor MR, Castro PA and Baier H. **Pentylentetrazole-Induced Changes in Peixe-zebra Behavior, Neural Activity and c-fos Expression.** *Neuroscience*, 2005; 131(3): 759–768.
28. Sprague J, Doerry E, Douglas S, Westerfield M and the ZFIN Group. **The zebrafish information network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research.** *Nucleic Acids Research*, 2001; 29(1): 87-90.

29. Schneider ACR, Santos JL, Porowski M, Schaefer PG, Maurer RL, Matte U and Silveira TR. **Implementação de um novo modelo de experimentação animal – zebrafish**. Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2009; 29(2): 100-103.
30. Bentes J. **Peixe – Fauna: Daniorerio**. 2009. Disponível em: <<http://www.peixefauna.com/t1010-danio-rerio-danio-zebra>>. Acesso em: 09 Jan 2012.
31. Shin JT and Fishman MC. **From zebrafish to human: modular medical models**. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2002; 3: 311-340.
32. Anderson KV, Ingham PW. **The transformation of the model organism: a decade of developmental genetics**. Nature Genetics, 2003; 33: 285-293.
33. Kimmel C and Warga R. **Cell lineage and developmental potential of cells in the zebrafish embryos**. Trends in Genetics, 1988; 5: 68-74.
34. Kimmel C. **Genetics and early development of zebrafish**. Trends in Genetics, 1989; 5: 283-288.
35. Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D and Singer F. **Production of clones of homozygous diploid zebra fish (Brachydaniorerio)**. Nature, 1981; 291: 293 – 296.
36. Grunwald DJ and Eisen JS. **Headwaters of the zebrafish - emergence of a new model vertebrate**. Nature Reviews Genetics, 2002; 3(9): 717-724.
37. Fishman MC. **Genomics Zebrafish – the canonical Vertebrate**. Science, 2001; 294(5545): 1290-1291.

38. Key B and Devine CA. **Zebrafish as an experimental model: strategies for developmental and molecular neurobiology studies.** *Methods in Cell Science*, 2003; 25: 1-6.
39. Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD and Johnson SL. **The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes.** *Genome Research*, 2000; 10(9): 1351-1358.
40. Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, Huang H, Hill-Force A and Talbot WS. **Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate Chromosomes.** *Genome Research*, 2000; 10: 1890-1902.
41. Sprague J, Bayraktaroglu L, Clements D, Conlin T, Fashena D, Frazer K, Haendel M, Howe DG, Mani P, Ramachandran S, Schaper K, Segerdell E, Song P, Sprunger B, Taylor S, Van Slyke CE and Westerfield M. **The Zebrafish Information Network (ZFIN): the zebrafish model organism database.** *Nucleic Acids Research*, 2003; 34: D581-585.
42. Hortopan GA, Dinday MT and Baraban SC. **Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy.** *Disease Models & Mechanisms*, 2010; 3(3-4): 144-148.
43. Berghmans S, Hunt J, Roach A and Goldsmith P. **Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants.** *Epilepsy Research*, 2007; 75: 18—28.

44. Hunt RF, Hortopan GA, Gillespie A and Baraban SC. **A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors.** *Experimental Neurology*, 2012; 237: 199-206.
45. Teng Y, Xie X, Walker S, Rempala G and Kozlowski DJ. **Knockdown of zebrafish *Lgi1a* results in abnormal development, brain defects and a seizure-like behavioral phenotype.** *Human Molecular Genetics*, 2010; 19(22):4409–4420.
46. Teng Y, Xie X, Walker S, Saxena M, Kozlowski DJ, Mumm JS and Cowell JK. **Loss of Zebrafish *lgi1b* Leads to Hydrocephalus and Sensitization to Pentylentetrazol Induced Seizure-Like Behavior.** *PLoSOne*, 2011; 6(9): e24596.
47. Binder DK and Scharfman HE. **Brain-derived neurotrophic factor.** *Growth Factors*, 2004; 22: 123-131.
48. Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. **Neurotrophin Signalling in health and disease.** *Clinical Science*, 2006; 110: 167-73.
49. Barde YA. **Trophic factors and neuronal survival.** *Neuron*, 1989; 2: 1525-1534.
50. Reichardt LF. **Neurotrophin-regulated signalling pathways.** *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 2006; 361: 1545-1564.
51. Kokaia Z, Bengzon J, Metsis M, Kokaia M, Persson H and Lindvall O. **Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system.** *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 1993; 90(14): 6711–6715.

52. Levi-Montalcini R and Hamburger V. **Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo.** The Journal of Experimental Zoology, 1951; 116: 321-361.
53. Barde YA, Edgar D and Thoenen H. **Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain.**The EMBO Journal, 1982; vol. 1: 549-553.
54. Ernfors P, Wetmore C, Olson L and Persson H. **Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family.** Neuron, 1990; vol. 5: 511-526.
55. Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolicks K, Goeddel DV and Rosenthal A. **Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB.** Neuron, 1991; vol.7: 857-866.
56. Thoenen H. **The changing scene of neurotrophic factors.** Trends in Neuroscience, 1991; 14: 165-170.
57. Dawbarn D and Allen SJ. **Neurotrophins and neurodegeneration.** Neuropathology and Applied Neurobiology, 2003; 29: 211-230.
58. Lu B, Pang PT and Woo NH. **The yin and yang of neurotrophin action.** Nature Reviews Neuroscience, 2005; 6: 603-614.
59. Walz R, Lenz G, Roesler R, Vianna MMR, Martins V, Brentani R, Rodnight R and Izquierdo I. **Time-dependent enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post-training infusion of nerve growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats.** European Journal of Neuroscience, 2000; 12(6): 2185-2189.

60. Gall CM. **Seizure-induced changes in neurotrophin expression: implications for epilepsy.** *Experimental Neurology*, 1993; 124: 150-166.
61. Garcia ML, Garcia VB, Isackson PJ and Windebank AJ. **Long-term alterations in growth factor mRNA expression following seizures.** *Neuroreport*, 1997; 8: 1445-1449.
62. Katoh-Semba R, Takeuchi IK, Inaguma Y, Ito H and Kato K. **Brain-derived neurotrophic factor, nerve growth and neurotrophin-3 selected regions of the rat brain following kainic acid-induced seizure activity.** *Neuroscience Research*, 1999; 35: 19-29.
63. Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM and Yancopoulos GD. **NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression.** *Neuron*, 1990; 5: 501-509.
64. Götz R, Köster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharf M and Thoenen H. **Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family.** *Nature*, 1994; 372(6503): 266-269.
65. Nilsson AS, Fainzilber M, Falck P and Ibáñez CF. **Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish.** *FEBS Letters*, 1998; vol.13 (424): 285-290.
66. Davis MI. **Ethanol-BDNF interactions: still more question than answers.** *Pharmacology & Therapeutics*, 2008; 118(1): 36-57.

67. Shimizu E, Hashimoto K, Okamura O, Koike K, Komatsu N, Komakiri C, Nakazato M, Watanabe C, Shinoda N, Okada S and Iyo M. **Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants.** Biological Psychiatry, 2003; 54(1): 70-75.
68. Yamada K and Nabeshima T. **Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes.** Journal of Pharmacological Sciences, 2003; 91(4): 267-270.
69. Hu Y and Russek SJ. **BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation.** Journal of Neurochemistry, 2008; 105(1): 1-17.
70. Larsson E, Nanobashvili A, Kokaia Z and Lindvall O. **Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats.** Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 1999; 19: 1220-1228.
71. Beck T, Lindholm D, Castren E and Wree A. **Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus.** Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 1994; 14: 689-692.
72. Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E and Kokaia M. **Neurotrophins and brain insults.** Trends in Neurosciences, 1994; 17: 490-496.
73. Koyama R and Ikegaya Y. **To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus.** The Neuroscientist, 2005; 11: 282-287.

74. Reibel S, Larmet Y, Lê B, Carnahan J, Marescaux C and Depaulis A. **Brain-derived neurotrophic factor delays hippocampal kindling in the rat.** *Neuroscience*, 2000; 100: 777-788.
75. Baldelli P, Forni PE and Carbone E. **BDNF, NT-3 and NGF induce distinct new Ca<sup>2+</sup> channel synthesis in developing hippocampal neurons.** *European Journal of Neuroscience*, 2000; 12: 4017-4032.
76. Boukhaddaoui H, Sieso V, Scamps F and Valmier J. **An activity-dependent neurotrophin-3 autocrine loop regulates the phenotype of developing hippocampal pyramidal neurons before target contact.** *The Journal of Neuroscience*, 2001; 21: 8789-8797.
77. French SJ, Humby T, Horner CH, Sofroniew MV and Rattray M. **Hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA levels are altered by local administration of nicotine, carbachol and pilocarpine.** *Brain Research. Molecular Brain Research*, 1999; 67: 124-136.
78. Mudò G, Jiang XH, Timmusk T, Bindoni M and Belluardo N. **Change in neurotrophins and their receptor mRNAs in the rat forebrain after status epilepticus induced by pilocarpine.** *Epilepsia*, 1996; 37: 198-207.
79. Marcinkiewicz M, Nagao T, Day R, Seidah NG, Chrétien M and Avoli M. **Pilocarpine-induced seizures are accompanied by a transient elevation in the messenger RNA expression of the prohormone convertase PC1 in rat hippocampus: comparison with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor expression.** *Neuroscience*, 1997; 76:425-439.
80. Poulsen FR, Lauterborn J, Zimmer J and Call CM. **Differential expression of brain-derived neurotrophic factor transcripts after pilocarpine-induced seizure-like activity is related to mode of Ca<sup>2+</sup> entry.** *Neuroscience*, 2004; 126: 665-676.

81. Mathern GW, Babb TL, Micevych PE, Blanco CE and Pretorius JK. **Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus.** *Molecular and Chemical Neuropathology*, 1997; 30: 53-76.
82. Barde YA. **Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons.** *Progress in Clinical and Biological Research*, 1994; 390: 45-56.
83. Westerfield M. **The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of the zebrafish (Danio rerio).** Eugene (OR): University of Oregon, Institute of Neuroscience, 2000. 4<sup>a</sup> edição.
84. Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, Poppe B, Roy NV, Paepe AD and Speleman F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biology*, 2002; 3(7): research0034.1-0034.12.
85. Livak KJ and Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods*, 2001; 25(4): 402-408.
86. Fetcho JR. **The utility of zebrafish for studies of the comparative biology of motor systems.** *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2007; 308(5): 550-562.
87. Holder N and Xu Q. **The zebrafish: an overview of its early development.** *Methods in Molecular Biology*, 2008; 461: 483-91.
88. Bode H. **Intracranial blood flow velocities during seizures and generalized epileptic discharges.** *European Journal of Pediatrics*, 1992; 151: 706-709.

89. Heinrich C, Lähteinen S, Suzuki F, Anne-Marie L, Huber S, Häussler U, Haas C, Larmet Y, Castren E and Depaulis A. **Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy.** *Neurobiology of Disease*, 2011; 42(1): 35-47.
90. Binder DK. **The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system.** *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2004; 548: 34-56.
91. Shetty AK, Zaman V and Shetty GA. **Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy: a lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting.** *Journal of Neurochemistry*, 2003; 87(1): 147-159.
92. Roux PP, Colicos MA, Barker PA and Kennedy TE. **p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure.** *The Journal of Neuroscience*, 1999; 19(16): 6887-6896.
93. Troy CM, Friedman JE and Friedman WJ. **Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons. Role of caspases.** *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277(37): 34295-34302.
94. Holm MM, Nieto-Gonzalez JL, Vardya I, Vaegter CB, Nykjaer A and Jensen K. **Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus.** *The Journal of Neuroscience*, 2009; 29(40): 12412-12418.
95. Teng KK and Hempstead BL. **Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004; 61(1):35-48.

96. Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb WC and Love DR. **Validation of zebrafish (Daniorerio) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization.** *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (Shanghai), 2007; 39(5): 384-390.
97. McCurley AT and Callard GV. **Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment.** *BMC Molecular Biology*, 2008; 9: 102.
98. Ullal GR, Michalski B, Xu B, Racine RJ and Fahnstock M. **NT-3 modulates BDNF and proBDNF levels in naïve and kindled rat hippocampus.** *Neurochemistry International*, 2007; 50: 866-871.
99. Merlio J, Ernfors P, Kokaia Z, Middlemas DS, Bengzon J, Kokaia M, Smith M, Siesjö BK, Hunter T, Lindvall O and Persson H. **Increased Production of the TrkB Protein Tyrosine Kinase Receptor after Brain Insults.** *Neuron*, 1993; 10: 151-164.
100. Shi S, Shao S, Yuan B, Pan F and Li Z. **Acute Stress and Chronic Stress Change Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Tyrosine Kinase-Coupled Receptor (TrkB) Expression in Both Young and Aged Rat Hippocampus.** *Yonsei Medical Journal*, 2010; 51(5): 661-671.