



PATRÍCIA GONÇALVES BARBALHO

INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES DE EPILEPTOGÊNESE

NO MODELO ANIMAL *ZEBRAFISH*

Apoio FAPESP

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PATRÍCIA GONÇALVES BARBALHO

INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES DE EPILEPTOGÊNESE
NO MODELO ANIMAL *ZEBRAFISH*

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer-Morelli

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA PATRÍCIA GONÇALVES BARBALHO E ORIENTADO PELA PROFA Dra. CLÁUDIA VIANNA MAURER-MORELLI.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "C. Vianna", is written over a horizontal dashed line.

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS
2013

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

B232i Barbalho, Patrícia Gonçalves, 1985-
 Investigação de marcadores de epileptogênese no modelo animal zebrafish /
 Patrícia Gonçalves Barbalho. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Epilepsia. 2. Interleucina-1 beta. 3. Peixe-Zebra. 4. Pentilenotetrazol. I. Maurer-Morelli, Cláudia Vianna, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Markers of epileptogenesis in the zebrafish seizure model

Palavras-chave em inglês:

Epilepsy

Interleukin-1 beta

Zebrafish

Pentilenotetrazol

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Cláudia Vianna Maurer-Morelli [Orientador]

Isclia Teresinha Lopes Cendes

Ana Lucia Brunialti Godard

Data de defesa: 29-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

PATRICIA GONÇALVES BARBALHO

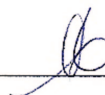
Orientador (a) PROF(A). DR(A). CLÁUDIA VIANNA MAURER MORELLI

MEMBROS:

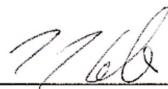
1. PROF(A). DR(A). CLÁUDIA VIANNA MAURER MORELLI



2. PROF(A). DR(A). ANA LUCIA BRUNIALTI GODARD



3. PROF(A). DR(A). ISCIA TERESINHA LOPES CENDES



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

Data: 29 de julho de 2013

DEDICATÓRIA

Para a minha amada família:

Reginaldo, Maria e Flávia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Reginaldo e Maria, que sempre fizeram de suas filhas a maior prioridade de suas vidas. Seus exemplos e ensinamentos me deram as bases para a minha formação. Obrigada por me apoiarem e me incentivarem sempre.

A minha irmã Flávia por estar sempre ao meu lado torcendo por mim.

A Profa Dra. Cláudia, por acreditar em mim, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos e amizade. Tenho pela Dra. Cláudia um grande respeito e admiração. Foi uma honra fazer parte da formação do Laboratório *Zebrafish*. Sinto uma satisfação enorme por ter ajudado a implantar o modelo *zebrafish* com sucesso.

Agradeço ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira e os seus alunos Gustavo Simões, Aline Spejo, Matheus Perez e Gabriela Chiarotto pela solicitude em me auxiliar sempre quando fosse preciso.

Agradeço ao Roberto, do Laboratório de Degeneração Nervosa, pelo auxílio e atenção todas as vezes que solicitei.

Sou grata também à Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes, à Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo e ao Prof. Dr. Róger Frigério Castilho pelas valiosas sugestões no meu exame de qualificação.

Aos meus queridos amigos Simoni Avansini, Rafaela Mendonça, Priscila Jacob, Luciana Ramalho e Fernando Marson, pelo apoio e conselhos que me deram durante este período de realização do meu mestrado. Agradeço a vida por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho.

À todos os colegas dos Laboratórios *Zebrafish* e Genética Molecular que me acolheram quando entrei no laboratório, por toda ajuda e boa convivência: Marilza, Madalena, Danyella, Jaíra, Fábio, Renato “Zé-Bola”, Rodrigo, Marina, André, Alexandre, Fernanda Reis, Rafael, Marlon e Danielle.

Agradeço aos funcionários Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em especial, à Dona Cida, Magnólia e Cláudia pela boa convivência.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

*“Tudo neste mundo tem uma resposta.
O que leva é tempo para se formular as perguntas”*

José Saramago

RESUMO

O *Danio rerio* é um peixe teleósteo popularmente conhecido como *zebrafish* que têm se destacado como modelo animal favorável para investigações genéticas devido à facilidade de manipulação *in vivo*, por sua transparência nas fases embrionária e larval e por seu desenvolvimento externo. Recentemente, foi demonstrado que o *zebrafish* é capaz de exibir padrão comportamental e alteração da atividade eletrográfica durante crise epiléptica como visto em roedores, tornando-o um modelo promissor para as investigações moleculares das epilepsias. Os estudos sobre os diferentes eventos já conhecidos das epilepsias no *zebrafish* estão apenas começando e, portanto, há ainda muito que ser investigado para uma melhor caracterização deste modelo para estudos em epilepsia. Estudos clínicos e em modelos animais mostraram que a crise epiléptica eleva os níveis da interleucina-1 beta e induz morte neuronal. Nesse sentido, o presente trabalho se propôs a investigar (i) o perfil temporal de expressão do transcrito do gene da interleucina-1 beta (*il1b*) no cérebro imaturo e adulto do *zebrafish* após a indução de crise epiléptica pelo agente químico Pentilenotetrazol por transcriptase reversa-PCR quantitativa e também, sua relação da expressão com a idade em que é realizada a indução da crise no cérebro imaturo e (ii) a morte neuronal pela histoquímica do Fluoro-Jade B (FJB) no cérebro imaturo e adulto do *zebrafish* após a indução de crise epiléptica pelo agente químico Pentilenotetrazol. Neste trabalho conseguimos estabelecer com sucesso as condições ideais para o acasalamento desta espécie e obtenção de embriões e, para a criação de larvas. Além disso, padronizamos o processamento histológico para a criosecção do cérebro do *zebrafish*. A análise

temporal do transcrito do gene *illb* revelou um padrão de expressão similar ao observado em roedores. A marcação por FJB não identificou inequivocadamente a presença de morte neuronal após crise epiléptica.

ABSTRACT

Danio rerio is a teleost fish popular named as zebrafish that has emerged as a suitable animal model for genetic investigations due to its features such as: facility for *in vivo* manipulation, transparency during embryonic and larval stages and external development. Recently, It was demonstrated that larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*) seizure model mimics the behavior, eletrographic and *c-fos* features that are well established in rodent models of epilepsy, making the zebrafish as a promising model for studying the molecular mechanisms underlying epilepsies. However, the potential of the zebrafish model for epilepsy studies has been partly described since the molecular changes and neuronal loss after seizure has not yet been investigated. Proinflammatory cytokines, such as interleukin-1beta (*il1b*), has shown to be up-regulated in surgical specimens of pharmaco-resistant patients and in experimental rodent models of seizure, however the profile of this cytokine in zebrafish model for epilepsy is unknown. For this reason, and in view of the importance of inflammatory response in the pathophysiology of epilepsy, we sought to investigate the temporal transcript profile of interleukin-1b (*il1b*), a proinflammatory cytokine, in adult and immature (larvae) zebrafish brain after Pentylentetrazole-evoked seizure, as well its aged-related expression in the developing brain by reverse transcriptase-quantitative PCR and neuronal death by Fluoro-Jade B (FJB) staining in adult zebrafish brain. Zebrafish breeding was successfully established during this work as well as the protocol for histological procedures using the zebrafish brain. Our results showed a short up-regulation of *il1b* mRNA levels after seizure in immature and adult zebrafish

brain similar as with those patterns observed in rodent models. FJB did not show a reliable neuronal death staining in the zebrafish brain after seizure.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
AVC	acidente vascular cerebral
BHE	barreira hematoencefálica
cDNA	ácido desoxirribonucleotídeo complementar ao RNA
Ct	threshold cycle: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção
COX	ciclooxigenase
COX-1	ciclooxigenase -1
COX-2	ciclooxigenase -2
COX-3	ciclooxigenase -3
DAE	drogas antiepilépticas
dpf	dias pós-fertilização
EEG	eletroencefalograma
EH	esclerose hipocampal
ELTM	epilepsia do lobo temporal mesial
EUA	Estados Unidos da América
GABA	ácido gama-aminobutírico
IL-1R1	receptor da interleucina 1
IL-1RA	antagonista do receptor da interleucina 1

IL-1 α	interleucina -1 α
IL-1 β	interleucina -1 β
ILAE	international league against epilepsy
IPI	insulto precipitante inicial
RNA _m	RNA mensageiro
NF- κ B	fator nuclear kappa B
NMDA	N-metil D-aspartato
PGs	prostaglandinas
PGE ₂	prostaglandina E-2
PGES	prostaglandina sintases
PTZ	pentilenotetrazol
RNA	ácido ribonucleico
RT	transcriptase reversa
SNC	sistema nervoso central
TLR	receptor semelhante a toll
TIR	receptor semelhante a toll com domínio interleucina-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação das crises epiléticas (modificado, Liga Internacional de Epilepsia, ILAE, 2010).....	22
Figura 2: Morfologia do <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>): larva com sete dias pós fertilização (A), jovem com um mês de vida (B) e adulto com seis meses de vida (C).....	33
Figura 3: Estágio de desenvolvimento embrionário do <i>zebrafish</i> conforme descrito por Kimmel, 2001.	34
Figura 4: Análise da expressão do transcrito da <i>illb</i> no cérebro imaturo (A) e adulto (B) após da indução de crise epilética por PTZ.....	51
Figura 5: Análise da expressão do transcrito da <i>illb</i> em larvas com sete dpf e 15 dpf.....	53
Figura 6: Latência das larvas com 7 dpf, 15 dpf e adulto (n = 10).....	54
Figura 7: Número de crises epiléticas em larvas com 7 e 15 pdf durante 20 minutos de exposição ao PTZ (n = 6).....	55
Figura 8: Localização do telencéfalo (seta) na larva de <i>zebrafish</i> com sete dias pós-fertilização. Corte transversal do telencéfalo corado com cresil violeta (Nissl) no aumento 10x (A) e 20x (B).....	56
Figura 9: Imagem panorâmica de um corte transversal do telencéfalo do <i>zebrafish</i> adulto corado com cresil violeta (Nissl) formada a partir de várias imagens fotografadas no aumento de 10x.....	57
Figura 10: Corte transversal da região dorsal telencéfalo do <i>zebrafish</i> adulto corado com cresil violeta (Nissl) fotografadas no aumento de 10x (A) e 20x (B).....	57

Figura 11: Corte transversal da cabeça de uma larva com sete dias pós-fertilização corado com Cressil Violeta (Nissl).....	58
Figura 12: Corte transversal da região dorsal telencéfalo do <i>zebrafish</i> adulto corado com Cressil Violeta (Nissl) no aumento de 10x.	58
Figura 13: Corte transversal da região dorsal do telencéfalo do zebrafish adulto marcado com Fluro-Jade B grupo controle (A: aumento 10x; B: aumento 20x).	60
Figura 14: Corte transversal da região dorsal telencéfalo do <i>zebrafish</i> adulto marcado com Fluro-Jade B 24h após a indução da crise epiléptica por PTZ (A: aumento 10x; B: aumento 20x).	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estágio de vida e idade do <i>zebrafish</i> (modificado, Kimmel, 1995).	39
Tabela 2: Tempo de coleta do cérebro após a indução da crise por PTZ.	41
Tabela 3: Fases do padrão comportamental durante a crise epiléptica em larvas e adultos.....	37

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Aspectos gerais das epilepsias: definição, epidemiologia, etiologia e classificação	20
1.2 Neurotransmissão, epilepsia e drogas antiepilépticas	23
1.3 Epileptogênese	24
1.4 Resposta à crise no cérebro em desenvolvimento e no cérebro maduro	26
1.4.1 Neuroinflamação: a via da interleucina-1 beta.....	28
1.4.2 Morte neuronal em resposta à crise epilética.....	31
1.5 Aplicação do <i>Danio rerio</i> para estudos em epilepsia	31
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Aspectos éticos.....	38
3.2 Cuidados e manutenção do <i>zebrafish</i> em laboratório	38
3.3 Indução de crise epilética por Pentilenotetrazol (PTZ) e coleta dos cérebros.....	39
3.4 Análise do padrão comportamental durante a crise epilética.....	41
3.5 Extração de RNA total	42
3.6 Eletroforese em gel de agarose para análise da qualidade do RNA.....	43
3.7 Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR).....	43

3.8	Quantificação relativa por PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	44
3.9	Análise estatística	46
3.10	Processamento histológico	46
3.10.1	Histoquímica Cresil Violeta (Nissl).....	47
3.10.2	Histoquímica Fluoro-Jade B.....	47
4.	RESULTADOS.....	49
4.1	Perfil temporal de expressão do transcrito do gene <i>il1b</i> no cérebro imaturo e adulto após indução da crise epiléptica.....	49
4.2	Relação da expressão do transcrito do gene <i>il1b</i> com a idade em que é realizada a indução da crise epiléptica no cérebro em desenvolvimento	52
4.3	Tempo de exposição ao Pentilenotetrazol até a ocorrência da primeira crise epiléptica (latência).....	53
4.4	Número de crises epilépticas observadas durante o tempo de exposição ao Pentilenotetrazol.....	54
4.5	Morfologia neuronal do telencéfalo na larva e no zebrafish adulto.....	55
4.6	Análise de morte neuronal através da histoquímica do Fluoro-Jade B no cérebro adulto do zebrafish após indução de crise epiléptica por PTZ	59
5.	DISCUSSÃO	61
5.1	O perfil temporal de expressão do transcrito do gene <i>il1b</i> após a indução de crise epiléptica por Pentilenotetrazol no cérebro imaturo e adulto no modelo zebrafish	63
5.2	A relação entre a idade de indução da crise no cérebro em desenvolvimento com a expressão do transcrito do gene <i>il1b</i>	68
5.3	Latência e número de crises.....	69

5.4	Marcação de morte neuronal por Fluoro-Jade B após indução de crise epilépica no cérebro adulto do zebrafish.....	72
6.	CONCLUSÕES	74
7.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	76
8.	ANEXO.....	87
	Anexo 1: Parecer do comitê de ética em pesquisa.	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das epilepsias: definição, epidemiologia, etiologia e classificação

As epilepsias formam um grupo de doenças neurológicas caracterizadas por crises epilépticas, as quais podem ser definidas como um distúrbio intermitente do sistema nervoso central causado por uma descarga elétrica anormal, súbita e sincronizada de um grupo de neurônios provocando crises epilépticas espontâneas e recorrentes ao longo da vida do paciente (Berg *et al.*, 2010). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2009), sua prevalência é de aproximadamente 0,8% sendo a segunda doença neurológica mais comum na população mundial, com maior incidência em países subdesenvolvidos e sendo mais frequente nos primeiros anos de vida. Em decorrência da atividade epiléptica recorrente, além dos impactos psicossociais, as funções cognitivas podem ser comprometidas ao longo do tempo (Berg *et al.*, 2010).

Em 2010 foi apresentado uma nova proposta de organização da terminologia e classificação das crises epilépticas, epilepsias e síndromes epilépticas por uma comissão da Liga Internacional Contra a Epilepsia (*International League Against Epilepsy*, ILAE) (Berg *et al.*, 2010). Esta nova organização da classificação baseia-se nos avanços das últimas duas décadas dos achados vídeo-eletroencefalográficos (vídeo-EEG), neuroimagem e da genética a fim de atualizar a Classificação da ILAE de 1989 (Berg *et al.*, 2010). Pela nova proposta, as crises epilépticas são classificadas em relação a sua localização em duas categorias dentre as quais incluem vários subtipos, são estas: (I) Generalizadas - as descargas elétricas podem se originar em diferentes regiões no cérebro e podem se espalhar atingindo regiões distantes

do local do foco epiléptico, que englobam os dois hemisférios cerebrais, mas não necessariamente envolve todo o córtex; (II) Focal - as crises se originam em redes neuronais que estão limitadas a um único hemisfério (figura 1) (Berg *et al.*, 2010). As características das crises dependem do local de início, da sua duração (breve ou longa) e frequência, portanto, a sintomatologia pode ser extremamente variada (Berg *et al.*, 2010). Desta forma o conceito de epilepsia abrange um grande grupo de entidades neurológicas cujo ponto em comum é a presença de crises epiléticas recorrentes (Berg *et al.*, 2010).

As epilepsias são classificadas de acordo com a sua etiologia, isto é, o processo (endógeno ou exógeno) que desencadeou a atividade epilética, em três grandes categorias: (I) Genética (idiopática) - mutação gênica¹, anomalia cromossômica ou predisposição/*background* genético²; (II) Estrutural/metabólica (Sintomática) - presença de uma lesão como, por exemplo, trauma, infecção, acidente vascular cerebral (AVC), malformação, entre outros; e (III) Desconhecida (criptogênica) quando não há nenhuma lesão identificável ou nenhuma causa genética provável que explique a origem para a ocorrência das crises epiléticas, através dos métodos diagnósticos atualmente disponíveis (Berg *et al.*, 2010). As síndromes epiléticas³ ou síndromes eletroclínicas por sua vez, relaciona o conjunto de diferentes entidades clínicas que tem em comum a idade de início das crises, o padrão eletroclínico e a etiologia (Engel *et al.*, 2006; Engel *et al.*, 2009).

¹ Como, por exemplo, mutações pontuais (de novo ou herança mendeliana) em genes de canais iônicos de sódio (SCN1A), de potássio (KCNQ1) e da subunidade 1 A do receptor de GABA (GABRA1).

² Padrão de herança complexa ou multifatorial em que polimorfismos do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) em genes candidatos podem aumentar ou diminuir a susceptibilidade de ocorrência de uma crise.

³ Exemplos de síndromes epiléticas: síndrome de West; síndrome de Otaharra; síndrome de Lennox-Gastaut; síndrome de Doose; síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Dravet.

Aqueles que não se enquadram na classificação de síndrome epilética são denominados de constelações (Engel *et al.*, 2006; Engel *et al.*, 2009).

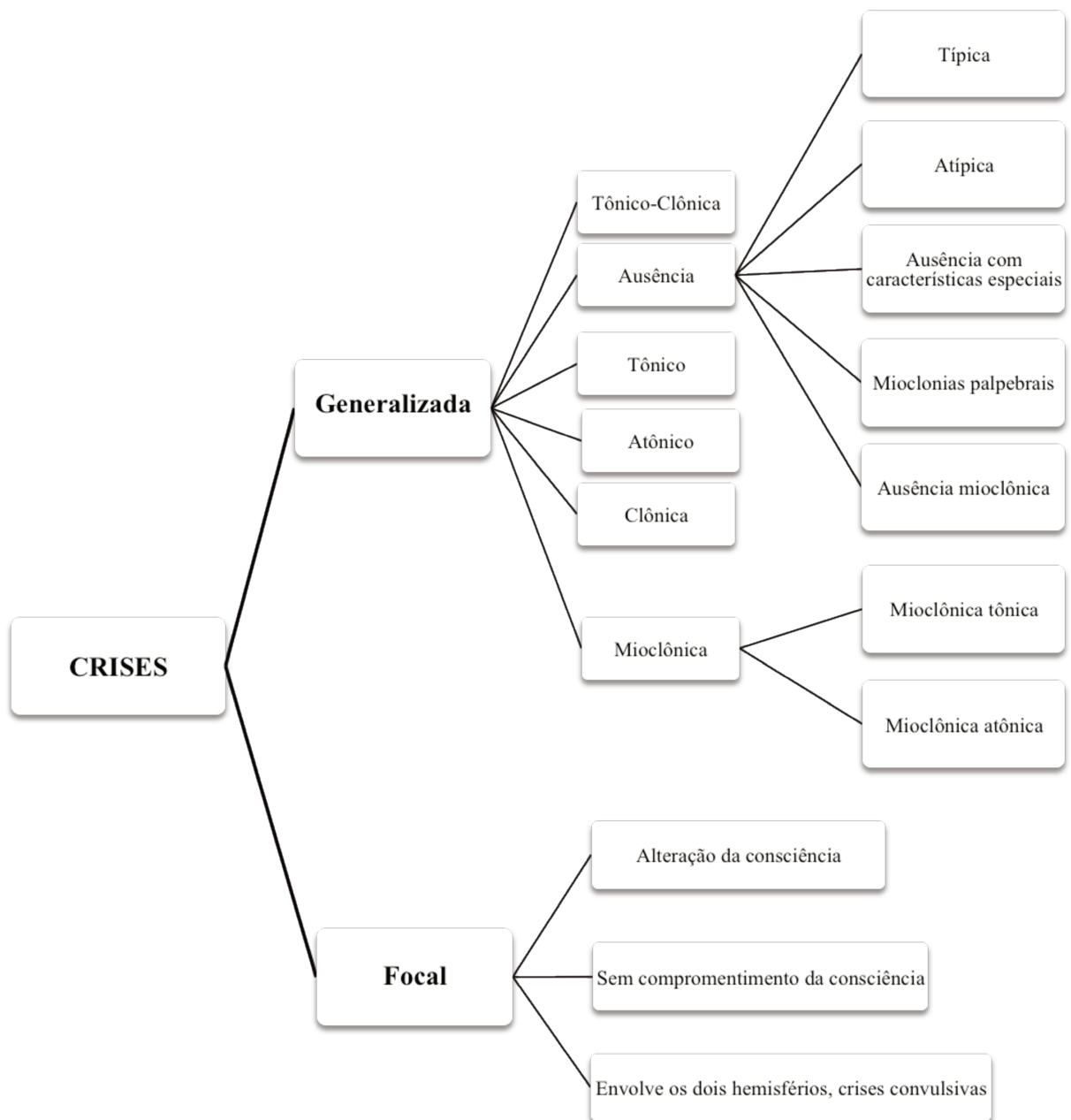


Figura 1: Classificação das crises epiléticas (modificado, Liga Internacional de Epilepsia, ILAE, 2010).

1.2 Neurotransmissão, epilepsia e drogas antiepilépticas

Para compreender como é gerada a atividade elétrica neuronal anormal durante a crise epilética faz-se necessário compreender primeiramente o mecanismo normal da comunicação neuronal. Os neurônios formam circuitos ou redes neuronais que comunicam entre si através das sinapses elétricas e as sinapses químicas em resposta a um estímulo (Gazzaniga, Ivry e Mangun, 1998). Nas sinapses elétricas, a transmissão do impulso dá-se pela passagem instantânea da corrente elétrica entre duas células através de estruturas denominadas junções gap ou junções comunicantes (Gazzaniga, Ivry e Mangun, 1998). Na sinapse química por sua vez, a transmissão do impulso envolve a liberação de neurotransmissores do terminal pré-sináptico na fenda sináptica e a sua ligação aos receptores específicos no terminal pós-sináptico desencadeando eventos que levam à despolarização (excitação) ou à hiperpolarização (inibição) do potencial de membrana (Gazzaniga, Ivry e Mangun, 1998).

O ácido gama-aminobutírico (GABA) e o glutamato são os principais neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC) (Petroff, 2002; Foster e Kemp, 2005; Alvestad *et al.*, 2011). O glutamato possui ação excitatória enquanto o GABA possui ação inibitória e, portanto, o equilíbrio na ação destes dois neurotransmissores é de fundamental importância para a homeostase do SNC (Petroff, 2002; Foster e Kemp, 2005; Alvestad *et al.*, 2011). As crises epiléticas refletem, portanto, o desequilíbrio transitório entre a neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica de um conjunto de neurônios e, a corrente elétrica, fruto da movimentação iônica através da membrana celular, pode ser detectada

através do exame de eletroencefalograma (EEG) (Petroff, 2002; Foster e Kemp, 2005; Alvestad *et al.*, 2011).

Atualmente, o tratamento das epilepsias baseia-se na supressão das crises pelo uso de drogas antiepilépticas (DAEs) (Kwan *et al.*, 2010). Muitos tipos de DAEs agem alterando a neurotransmissão, isto é, dependendo da neurotransmissão alvo, as DAEs podem simular a ação de neurotransmissores em seus receptores pós-sinápticos, aumentar a liberação de neurotransmissores, prevenir a sua recaptação e/ou reduzir a capacidade de um neurotransmissor em se ligar aos seus receptores pós-sinápticos (antagonista) (Kwan *et al.*, 2010). Entretanto, aproximadamente 30% dos pacientes com epilepsia são refratários⁴ à medicação e ainda não há nenhum tratamento que possa prevenir ou interromper o desenvolvimento das crises epiléticas (Kobayashi *et al.*, 2003; Guedes *et al.*, 2006; Pitkänen, 2010; Kwan *et al.*, 2010).

1.3 Epileptogênese

As epilepsias estruturais/metabólicas geralmente desenvolvem-se em três fases, são elas: (1) fase aguda; (2) fase latente ou epileptogênese; e (3) fase crônica (Pitkänen, 2010; Pitkänen e Lukasiuk, 2011). Um insulto precipitante inicial (IPI) como, por exemplo, AVC, infecção no SNC, traumatismo crânio-encefálico dentre outros, pode contribuir para a ocorrência de uma crise epilética (Pitkänen e Lukasiuk, 2011). O período que se segue após

⁴ Os pacientes adultos com epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) é tipo mais frequente de farmacoresistência à drogas antiepiléptica (Jerome Engle Jr, 2001; Alvestad *et al.*, 2011).

a primeira crise epiléptica é chamado de fase latente ou epileptogênese. Nesta fase, não há qualquer manifestação de crise epiléptica, entretanto, em decorrência da tentativa de recuperação ao dano/injúria podem ocorrer uma série de alterações estruturais e moleculares que eventualmente podem levar a ocorrência de crises epilépticas espontâneas e recorrentes tardiamente (Pitkänen e Lukasiuk, 2011). A epileptogênese se refere, portanto, ao período que começa após um IPI e termina com o aparecimento da primeira crise epiléptica espontânea. Sendo assim, a epileptogênese, como o próprio nome indica, é o ponto inicial da reorganização da rede epileptogênica e da modulação de expressão gênica em resposta a um insulto durante um período variável de tempo (dias, meses ou anos) (Pitkänen e Sutula, 2002; Loscher e Brandt, 2010; Pitkänen e Lukasiuk, 2011). Entretanto, alguns autores afirmam que a epileptogênese por ser um processo dinâmico e progressivo não termina com o aparecimento da primeira crise espontânea uma vez que as próprias crises podem agravar este processo e, portanto, perpetuariam na fase crônica, quando as crises epilépticas tornam-se espontâneas e recorrentes (Gitaí *et al.*, 2008; Pitkänen e Sutula, 2002; Pitkänen e Lukasiuk, 2011).

O conhecimento sobre o processo epileptogênico advém dos modelos animais de crises epilépticas espontâneas (*status epilepticus*) que reproduzem a fenomenologia (insulto inicial - fase latente - crises espontâneas) e as alterações histopatológicas encontradas em espécimes cirúrgicos de pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM) com esclerose hipocampal (EH) farmacorresistentes (Leite *et al.*, 1990; Lado *et al.*, 2000; Lado *et al.*, 2002; Pitkänen e Sutula, 2002; Silva e Cavalheiro, 2004; Pitkänen *et al.*, 2007; Pitkänen e Lukasiuk, 2011). Estas alterações incluem: neurodegeneração; ativação da gliose reativa; neurogênese; brotamento das fibras musgosas (*sprouting*); quebra da barreira

hematoencefálica (BHE); ativação de fatores de transcrição; e aumento da resposta inflamatória (Pitkänen e Sutula, 2002; Pitkänen e Lukasiuk, 2011). Embora o acesso a esses espécimes cirúrgicos seja de extrema importância, o estudo a partir do tecido hipocampal de humanos fica limitado ao período crônico da doença, ou seja, ao resultado final de um processo patológico e, portanto, as alterações histopatológicas observadas na fase crônica permitem apenas realizar estudos retrospectivos (Guedes *et al.*, 2006). Neste sentido, os modelos animais são de fundamental importância para a realização de estudos prospectivos visando o acompanhamento temporal das alterações moleculares e estruturais durante a epileptogênese de forma a estabelecer uma circuitaria anormal antes da primeira crise espontânea (Guedes *et al.*, 2006; Pitkänen, 2010; Pitkänen & Lukasiuk, 2011). A epileptogênese é, portanto, uma fase que desperta grande interesse da comunidade científica por representar uma oportunidade de tratamento que visa interromper ou modificar o processo epileptogênico (Loscher e Brandt, 2010; Pitkänen, 2010).

1.4 Resposta à crise no cérebro em desenvolvimento e no cérebro maduro

As crises podem acometer o indivíduo em qualquer fase da vida, porém são mais frequentes durante a infância (Lado *et al.*, 2000; Rakhade e Jesen, 2009; Frances Jesen, 2009). Esta maior incidência é devido ao fato do cérebro imaturo ser mais susceptível a ocorrência de crise epiléptica uma vez que essa fase do desenvolvimento é marcada pelo predomínio de circuitos excitatórios que promove uma grande plasticidade neuronal, isto é, remodelamento e formação das conexões sinápticas (Holmes & Ben-Hari, 1998). O GABA

é o principal neurotransmissor inibitório no cérebro adulto, entretanto, no início de desenvolvimento o GABA atua como neurotransmissor excitatório exercendo efeitos tróficos, contribuindo assim para a formação das conexões sinápticas (Ganguly *et al.*, 2001; Yehezkel Ben-Ari, 2002). Entretanto, as consequências da crise epilética no cérebro imaturo, diferentemente do cérebro maduro, não são necessariamente acompanhadas pela morte neuronal (Lado *et al.*, 2000; Baram *et al.*, 2002).

Estudos realizados em modelos animais mostraram que a taxa de morte neuronal é baixa ou ausente no cérebro imaturo⁵ após a crise epilética, porém não significa que não haverá impacto no desenvolvimento cognitivo (Baram *et al.*, 2002). O cérebro em desenvolvimento é altamente plástico e, portanto, as crises epiléticas podem promover alterações de conectividade nas redes neuronais contribuindo assim para a formação de circuitos neuronais anormais, aumentando o risco de desenvolvimento de crises espontâneas e recorrentes tardiamente (Lado *et al.*, 2000). Isto revela que a morte neuronal não é um fator *sine qua non* para epileptogênese, em outras palavras, a epileptogênese acontece independentemente de ocorrer morte neuronal ou não (Lado *et al.*, 2000; Baram *et al.*, 2002).

Sendo assim, há um grande incentivo na identificação de biomarcadores específicos para fins terapêuticos, pois o tratamento com o uso de DAEs para o cérebro em desenvolvimento pode ter consequências sobre o estado neurológico em longo prazo e pode

⁵ É importante ressaltar que a morte celular programada é um evento natural no cérebro em desenvolvimento sendo fundamental para o estabelecimento do número final de neurônios como também, na formação da circuitaria neuronal (Nijhawan *et al.*, 2000).

não ser a estratégia mais adequada a ser administrada para o cérebro em desenvolvimento uma vez as DAE podem interferir na função neuronal normal (Lado *et al.*, 2000).

1.4.1 Neuroinflamação: a via da interleucina-1 beta

A investigação das vias moleculares associadas ao processo epileptogênico despertou grande interesse na comunidade científica para investigação de biomarcadores, isto é, como um indicador de um processo patológico (Pitkänen, 2000; Pitkänen, 2010; Pitkänen e Lukasiuk, 2011). Dentre as alterações vistas, tanto na epileptogênese quanto na fase crônica, a resposta inflamatória tem recebido atenção especial por ser um potencial alvo para intervenção clínica (Vezzani e Granata, 2005; Vezzani *et al.*, 2008; Heida *et al.*, 2009; Vezzani *et al.*, 2011; Ravizza *et al.*, 2011; Vezzani e Friedman, 2011; Pernot *et al.*, 2011).

Estudos realizados em modelos animais demonstraram que a crise *per se* promove aumento da resposta inflamatória (Maroso *et al.*, 2011). Após um insulto, as células lesionadas expressam moléculas que são reconhecidas pelos receptores do sistema imune natural ou inato e ativam vias de transdução intracelulares que promovem a inflamação (Allan *et al.*, 2005; Ravizza *et al.*, 2008a; Rijkers *et al.*, 2009). O sistema imune inato apresenta receptores de reconhecimento contra patógeno e também, receptores de reconhecimento de moléculas endógenas que são associadas ao perigo e que são liberadas durante a lesão celular ou estresse tais como, os receptores semelhantes a Toll (*Toll like-receptors*; TLRs). Os receptores semelhantes a TLRs são uma família de receptores de

reconhecimento padrão, altamente conservados evolutivamente, expressos em muitos tipos celulares e encontrados na superfície celular e em membranas intracelulares (Allan *et al*, 2005; Maroso *et al*, 2011). A sinalização por TLRs promove a ativação fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que é requerido para a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Allan *et al*, 2005; Maroso *et al*, 2011).

As citocinas são mediadores da inflamação, isto é, são moléculas responsáveis por mediar a resposta entre as células lesionadas e o sistema imune (Allan *et al*, 2005). Sua ação é iniciada pela ligação aos receptores de membrana específicos nas células-alvo na qual desencadeia a ativação de uma via de sinalização (Allan *et al*, 2005). Dentre as citocinas, a interleucina- 1 (IL-1) é a citocina pró-inflamatória que mais tem sido investigada tanto em humanos como nos modelos animais (Vezzani & Granata, 2005; Vezzani *et al*, 2008; Vezzani *et al*, 2011; Ravizza *et al*, 2011; Vezzani & Friedman, 2011; Pernot *et al*, 2011).

Existem duas formas da IL-1, a IL-1 α e a IL-1 β , que são transcritos por genes diferentes, mas possuem sequências altamente semelhantes (Allan *et al*, 2005). Ambos os polipeptídeos, IL-1 α e IL-1 β , são sintetizados como precursores e são secretados como proteínas maduras (Allan *et al*, 2005). A forma ativa da IL-1 β é o produto clivado por uma protease, a cisteína caspase-1, mas a IL-1 α é ativa tanto como o precursor como o produto clivado (Allan *et al*, 2005). Portanto, as primeiras etapas de regulação da expressão da IL-1 β ocorrem em nível transcricional e pós-transcricional através da clivagem pela caspase-1 que é, por sua vez, ativada pelo complexo do inflamassomo.

Os efeitos biológicos da IL-1 α e a IL-1 β são semelhantes e ocorrem através da sua ligação ao receptor de membrana IL-1 tipo I (IL-1r1) que promove a ativação de vias de

transdução de sinal (Allan *et al*, 2005). Além da IL-1 α e IL-1 β , existe um terceiro tipo de ligante do IL-1r1, o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) (Allan *et al*, 2005). O IL-1ra se liga ao IL-1r1, mas é biologicamente inativo, de modo que não ativa nenhuma via de transdução de sinal (Allan *et al*, 2005). Tanto a IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra apresentam expressão constitutiva, mas são encontrados em níveis baixos (mRNA e proteína) no cérebro (Allan *et al*, 2005). Diversos estímulos podem aumentar ou diminuir a sua expressão. Além disso, tem sido observado que a IL-1 β tem sua expressão aumentada após as crises epiléticas, entretanto, se o seu papel possui um efeito epileptogênico ou protetor ainda não está bem esclarecido, pois a sua contribuição para ambos os efeitos já foram relatados (Vezzani & Granata, 2005; Vezzani *et al*, 2008; Pascoal, 2010; Vezzani *et al*, 2011; Ravizza *et al*, 2011; Vezzani & Friedman, 2011; Pernot *et al*, 2011). Entretanto, acredita-se que a ativação da via de sinalização da IL-1 β /IL-1r pode contribuir para um processo patológico de hiperexcitabilidade neuronal se a duração da ativação desta via exceder o limiar homeostático (Maroso *et al*, 2011). Porém, vale ressaltar que para compreender o papel da IL-1 β nas epilepsias é necessário conhecer em qual fase ela está sendo analisada, ou seja, se seu papel está sendo investigado na fase aguda ou na fase crônica da epilepsia, pois o seu papel em cada uma dessas fases pode ser diferente (Vezzani & Granata, 2005; Vezzani *et al*, 2008; Pascoal, 2010; Vezzani *et al*, 2011; Ravizza *et al*, 2011; Vezzani & Friedman, 2011; Pernot *et al*, 2011).

1.4.2 Morte neuronal em resposta à crise epiléptica

Sabe-se que a ocorrência da crise epiléptica promove o aumento da liberação do glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC que atua se ligando aos receptores pós-sinápticos N-metil D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA), receptores de cainato e receptores metabotrópicos (Lado *et al.*, 2000; Baram *et al.*, 2002; Yehezkel Ben-Ari, 2008). A hiperexcitação prolongada pode ocasionar a morte neuronal em consequência dos efeitos excitotóxicos decorrentes da hiperativação dos receptores glutamatérgicos (Lado *et al.*, 2000; Baram *et al.*, 2002; Yehezkel Ben-Ari, 2008). Além disso, alguns trabalhos mostraram que a IL-1 β pode contribuir para a morte celular, pois ela apresenta influencia na excitabilidade neuronal aumentando a neurotransmissão glutamatérgica (Viviani *et al.*, 2003; Bernardino *et al.*, 2005; Allan *et al.*, 2005), reduzindo a neurotransmissão gabaérgica (Wang *et al.*, 2000; Allan *et al.*, 2005), inibindo a recaptação de glutamato pelos astrócitos (Hu *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2000) e também, pela ação neurotóxica promovida pela aplicação exógena de citocinas (ação sinérgica) (Chao *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2000).

1.5 Aplicação do *Danio rerio* para estudos em epilepsia

O *Danio rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish*, peixe-paulistinha ou peixe-zebra (figura 2), é uma espécie de peixe vertebrado teleósteo que pertence à família *Cyprinidae*. O *zebrafish* é um peixe de água doce nativo da região sul do continente

Asiático, cujo ambiente natural é caracterizado por rios de águas claras, de baixa correnteza e baixa profundidade, sendo encontrado principalmente em plantações de arroz (Engeszer *et al.*, 2007; Lawrence, 2007; Spence *et al.*, 2008). Esta espécie vive em cardumes (Lawrence, 2007) e chega a medir, aproximadamente, 4-5 centímetros de comprimento e 1cm de largura. Sua morfologia é caracterizada por apresentar um corpo fusiforme com listras longitudinais (5 a 7) que se estendem a partir do final do opérculo até nadadeira caudal com boca projetada para cima (Barman, 1991, Schneider *et al.*, 2009), conforme pode ser observado na figura 2C.

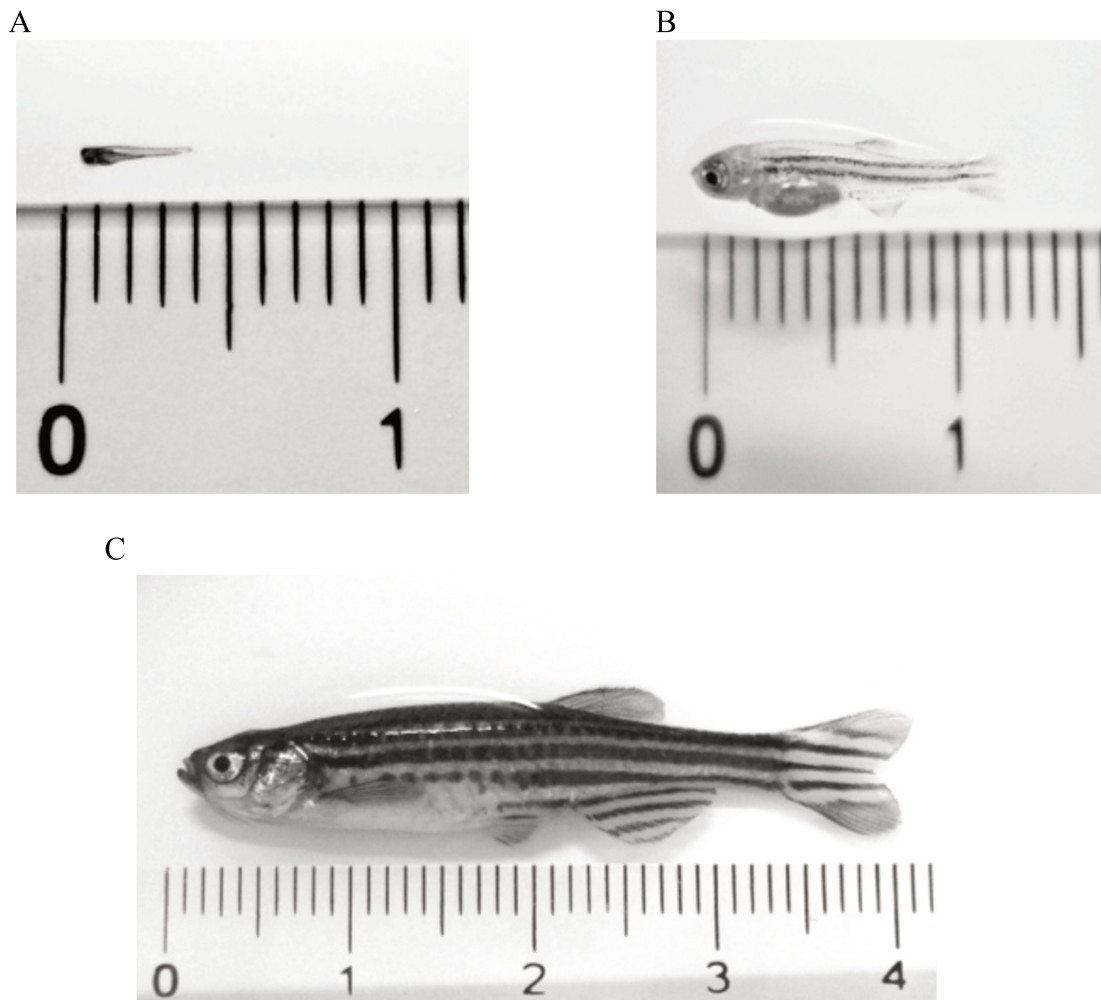


Figura 2: Morfologia do *zebrafish* (*Danio rerio*): larva com sete dias pós fertilização (A), jovem com um mês de vida (B) e adulto com seis meses de vida (C). Fonte: arquivo pessoal (LabZeb).

Como modelo animal para estudos genéticos, o *zebrafish* possui muitas vantagens, dentre elas destacam-se o baixo custo, a facilidade de análise *in vivo* em relação aos estudos que empregam roedores e o fato do *zebrafish*, por ser um vertebrado, estar evolutivamente mais próximo de humanos do que a *Drosophila melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans*. O seu pequeno tamanho, ciclo de vida curto (fases embrionária, larval e adulta) e sua alta taxa de fecundação permitem que um grande número de peixes possa ser criado em um

espaço relativamente pequeno. Outro fator interessante é que o desenvolvimento externo dessa espécie permite não só acompanhar as fases de desenvolvimento embrionário e larval como também facilita a manipulação genética do embrião (figura 3). Somada a isso, sua transparência possibilita a visualização de sua anatomia com o uso de um microscópio óptico. (Driever e Fishman, 1996; Fishman, 2001; Key e Devine, 2003). Além dos aspectos citados acima, aproximadamente, 70% dos genes desta espécie são homólogos aos de humanos com largas regiões de conservada sintenia⁶ (Barbazuk *et al.*, 2000; Shin e Fishman, 2002; Howe *et al.*, 2013).

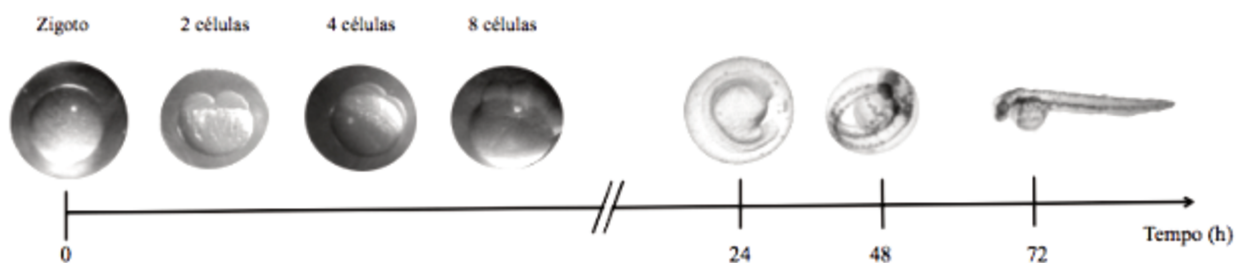


Figura 3: Estágio de desenvolvimento embrionário do *zebrafish* conforme descrito por Kimmel, 2001. Fonte: arquivo pessoal (LabZeb).

Em relação ao SNC do *zebrafish*, fortes evidências filogenéticas entre os grupos de vertebrados (peixes, répteis, aves e mamíferos) indicam a provável homologia entre o

⁶ A similaridade entre o genoma de duas espécies pode ser comparada em relação a localização dos genes nos cromossomos. As regiões correspondentes em sintenia revelam que os genes estão dispostos na mesma ordem nos mesmos cromossomos em espécies diferentes.

pallium lateral e *pallium* medial do telencéfalo de peixes teleósteos com o hipocampo e amígdala de mamíferos, respectivamente (Rodriguez et al., 2002; Portavella e Vargas, 2005; Salas et al., 2006; Vargas e Portavella, 2009; Durán et al., 2010). Embora o processo de desenvolvimento embrionário do telencéfalo de teleósteos seja por inversão, a homologia entre essas estruturas foi inicialmente sugerida através de estudos de anatomia comparada e então confirmada por estudos embriológicos, comportamentais e funcionais (Rodriguez et al., 2002; Portavella e Vargas, 2005; Salas et al., 2006; Vargas e Portavella, 2009; Durán et al., 2010).

A aplicação do *zebrafish* para estudos em epilepsia foi descrito por Baraban e colaboradores em 2005. Em seu trabalho foram estabelecidos os fatores comportamentais, eletrográficos e moleculares promovidos pela exposição de larvas com sete dias pós-fertilização (dpf) ao agente químico convulsivante pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista do receptor GABA, isto é, a ligação do PTZ aos receptores GABA_A impede a ligação do GABA e, conseqüentemente, não ativa a cascata de sinalização (Baraban *et al.*, 2005; Hortopan *et al.*, 2010). É importante destacar que o cérebro da larva com cinco dias após a fertilização já apresenta todos os tipos celulares necessários para a geração de descargas elétricas excitatórias (Hortopan *et al.*, 2010). Neste estudo, Baraban e colaboradores demonstraram que o PTZ elicit, de forma dose-dependente, crises epilépticas que foram caracterizadas em três fases: fase I - aumento da atividade do nado; fase II - movimentos circulares vigorosos; e fase III – breves movimentos estereotipados que mimetizam crises tônico-clônicas com posterior perda de postura. A análise eletrográfica mostrou que o PTZ evoca descargas ictais e interictais semelhantes àquelas observadas em mamíferos. A expressão espacial do RNA mensageiro (RNAm) do gene *c-fos*, um conhecido marcador de

atividade neuronal, foi investigada por hibridização *in situ* e mostrou uma elevação dos níveis de transcrito deste gene, sendo este, um resultado semelhante aos observados nos modelos roedores. O mesmo protocolo de indução foi realizado recentemente para o *zebrafish* adulto (Pineda *et al*, 2011) e o padrão do registro eletrográfico apresentou descargas ictais e interictais semelhantes aos vistos em humanos e roedores.

Embora o uso do *zebrafish* para estudos em epilepsia tenha sido validado por Baraban e colaboradores (2005) ainda há aspectos que precisam ser explorados para gerar maiores conhecimentos sobre o *zebrafish* como modelo de crise epiléptica e comparar as semelhanças com os outros modelos animais para o estudo em epilepsia. Neste sentido, esse trabalho se propôs a investigar se a crise epiléptica é capaz de causar dois achados importantes na epileptogênese de outros modelos, a morte neuronal e a alteração o perfil da expressão do transcrito do gene interleucina- 1 β (*Il1-b*) no cérebro imaturo e adulto do *zebrafish*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os marcadores da epileptogênese, *Il1-b* e morte neuronal, no cérebro de *zebrafish* para melhor caracterizar este modelo animal para pesquisas em epilepsia.

2.2 Objetivos específicos

(I) Investigar o padrão de expressão temporal do transcrito do gene *Il1-b* após a crise epiléptica induzida por PTZ no cérebro de *zebrafish* imaturo (larva com sete dias pós-fertilização) e adulto pela técnica da Transcriptase Reversa- PCR quantitativa;

(II) Avaliar se o insulto promovido pelo PTZ é capaz de induzir morte neuronal no cérebro imaturo e adulto 24h pós-crise epiléptica, por meio da técnica histoquímica do Fluoro-Jade B.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP, protocolo 2445-1 (anexo 1).

3.2 Cuidados e manutenção do *zebrafish* em laboratório

Os peixes adultos foram adquiridos em loja de *pet shop* convencional e passaram por um período de quarentena. Durante a quarentena, os peixes foram observados diariamente para a verificação de animais doentes, a fim de separá-los imediatamente dos demais, evitando-se assim uma contaminação de todo o aquário. Os animais foram abrigados em uma sala com controle de temperatura e do ciclo claro-escuro (fotoperíodo), sendo o período de claridade de 14 horas e o período de escuro de 10 horas (Westerfield, 2000). Os animais foram mantidos em aquários de 30 e 20 litros com uma densidade de 2-4 peixes/litro.

A maturidade sexual desta espécie é atingida entre 3-6 meses de vida e a sua desova está associada ao fotoperíodo, portanto, a sua reprodução ocorre geralmente nas primeiras horas da luz do dia (Lawrence, 2007; Spence *et al.*, 2008). A reprodução em laboratório pode ser feita de acordo com o método descrito por Westerfield (2000) como também podem ser colocados bolinhas de gude ou bolinhas de cerâmica no fundo dos aquários para

que, desta forma, os embriões fiquem protegidos evitando-se a sua predação pelos animais adultos. Os embriões foram coletados e abrigados em placas de petri dentro de uma incubadora para manter as condições ideais de temperatura para sua eclosão, que ocorre entre 48-72 horas após a fertilização (tabela 1) (Kimmel, 1995; Westerfield, 2000).

Tabela 1: Estágio de vida e idade do *zebrafish* (modificado, Kimmel, 1995).

Embrião	0h - 72h após a fertilização
Larva	3 - 29 dias
Jovem	30 dias - 3 meses
Adulto Reprodutivo	≥ 3 meses

3.3 Indução de crise epiléptica por Pentilenotetrazol (PTZ) e coleta dos cérebros

A indução da crise por PTZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi realizada em larvas (cérebro imaturo) com sete dias pós fertilização (dpf), 15 dpf e em animais adultos (cérebro maduro). Para a indução das crises epilépticas no cérebro imaturo, as larvas foram colocadas em placas de cultura de 24 poços preenchidas com uma solução de 15mM de PTZ. Da mesma forma, os animais do grupo controle foram colocados em poços da placa contendo somente a água livre de PTZ. Em cada poço foi colocada uma única larva e, após 20 minutos de exposição ao PTZ, as larvas experimentais foram transferidas para placas de petri. É importante ressaltar que após a exposição ao PTZ, os animais passaram por duas lavagens em placas de petri contendo água de aquário para a remoção de qualquer resíduo

de PTZ do corpo do animal. O mesmo procedimento foi feito para os animais do grupo controle. É importante destacar que o tempo de 20 minutos foi escolhido baseado no tempo de exposição em que foram obtidos os resultados comportamentais, eletrográficos e de expressão gênica no trabalho feito por Baraban e colaboradores (2005).

Para a indução das crises epiléticas no cérebro adulto, os peixes foram transferidos individualmente para um becker de vidro de 200 ml contendo uma solução de PTZ 15 mM. Os animais permaneceram expostos ao PTZ até a ocorrência da crise epilética. Os animais adultos do grupo controle foram colocados em becker de vidro de 200 ml contendo água livre de PTZ. Cada animal do grupo controle permaneceu o mesmo tempo que o animal do grupo teste, desta forma, o experimento foi feito intercalando-se um animal teste com um animal controle.

As coletas dos cérebros foram feitas para dois propósitos: análise histológica e análise de RNAm do gene da *il1b*. Os tempos de coleta após a indução de crise epilética por PTZ estão resumidos na tabela 2. Após a indução, os animais adultos foram anestesiados por hipotermia (crioanestesia), sacrificados por decapitação e seus cérebros imediatamente retirados e congelados em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA total ou mergulhado em solução de paraformaldeído 4% (PBS, pH 7.4) para posterior análise histológica. Para a coleta dos cérebros no caso das larvas, devido a dificuldade de manipulação por causa do seu pequeno tamanho (aproximadamente 1cm, figura 2A), após a crioanestesia, a cabeça inteira foi cortada e congelada em nitrogênio líquido para a extração do RNA total ou colocada em um tubo cônico fálcon de 15ml contendo solução de paraformaldeído 4% para posterior análise histológica.

Tabela 2: Tempo de coleta do cérebro após a indução da crise por PTZ.

Animais	Idade da indução por PTZ	Tempo de coleta do cérebro após a indução
Larva (cérebro imaturo)	7 dias	0.05h; 1 h; 6 h; 12 h; 24 h e 48 h
Adulto (cérebro maduro)	> 3 meses	0.05 h; 1 h; 6 h; 12 h; 24 h e 48 h

3.4 Análise do padrão comportamental durante a crise epiléptica

A análise do padrão comportamental durante a crise epiléptica em larvas e em animais adultos foram feitas a partir de observação visual e baseadas nas fases descritas na literatura (Baraban *et al.*, 2005; Mussulini *et al.*, 2013) (tabela 3). Este padrão comportamental foi observado em todos os animais quando expostos ao PTZ. A partir da análise comportamental, foi obtido o tempo entre a exposição ao PTZ até a ocorrência da primeira crise epiléptica (latência), assim como, o número total de crises durante os 20 minutos de exposição ao PTZ.

Tabela 3: Fases do padrão comportamental durante a crise epiléptica em larvas e adultos.

Fases	Larva	Adulto
Fase 1	Aumento da atividade do nado	Aumento da atividade do nado e aumento do movimento opercular
Fase 2	Movimentos circulares vigorosos	Nado rápido, com movimentos para a direita e para a esquerda
Fase 3	Breves movimentos estereotipados que mimetizam crises tônico-clônicas com posterior perda de postura.	Movimentos erráticos rápidos para esquerda e para a direita
Fase 4	-	Movimentos estereotipados que mimetizam crises clônicas (contração muscular)
Fase 5	-	Movimentos estereotipados que mimetizam crises tônico-clônicas com posterior perda de postura.
Referência	Baraban <i>et al.</i> , 2005	Mussulini <i>et al.</i> , 2013

3.5 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com o protocolo descrito resumidamente a seguir: O tecido foi macerado e homogeneizado em trizol em um microtubo de 1,5ml e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos; em seguida, após a adição do clorofórmio, foi incubado a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugado a 4° C a 12.000 RCF por 10

minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e então foi adicionado álcool isopropílico, incubado a temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 RCF em temperatura 4° C por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e adicionado etanol 75% e o material centrifugado a 7.600 RCF em temperatura 4° C por 10 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em água milliQ. Após a extração, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria em equipamento Epoch (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA).

3.6 Eletroforese em gel de agarose para análise da qualidade do RNA

Após a extração do RNA total, a fim de se verificar a qualidade e integridade do material obtido, foram realizadas eletroforeses em gel de agarose 2% das amostras.

3.7 Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR)

A síntese do cDNA a partir do RNA total foi realizada utilizando-se o *kit High Capacity* (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). Para a realização da transcrição reversa seguida de PCR todas as amostras foram ajustadas em 1 µg de RNA. O protocolo da reação está descrito resumidamente a seguir: 2 µl de Buffer (10x); 0,8 µl de dNTP mix (25x, 100 mM); 1 µl da Multiscribe transcriptase reversa; 1 µg de RNA em volume final de

20 µl completado com água milliQ. As condições de termociclagem utilizadas foram: 25° C por 10 minutos, 37° C por 120 minutos e 85° C por 5 segundos.

3.8 Quantificação relativa por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Para a análise quantificação relativa a partir do RNAm foram utilizados cinco amostras de cada tempo para o grupo controle e cinco amostras para o grupo experimental. É importante destacar que cada amostra foi composta por um *pool* de dois cérebros para os animais adultos e um *pool* de mais de 20 cabeças de larvas para a obtenção de RNA total em quantidade suficiente para a quantificação dos transcritos.

As reações de PCR quantitativa em tempo real foram realizadas pelo sistema TaqManTM (Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Os *primers* (*assays*) foram desenhados com uma sonda marcada com o fluoróforo FAM para os genes de referências *eflα* e *bactin* e, para o gene interesse da *illb*. Estes dois genes de referência foram escolhidos a partir dos trabalhos da literatura que avaliaram os melhores genes de referência para diferentes estágios de desenvolvimento e de acordo com o sexo para o *zebrafish* (Tang *et al.*, 2007; McCurley e Callard, 2008; Casadei *et al.*, 2010). Os dois genes de referência normalizam a expressão do gene de interesse nas amostras. Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão, foi realizada a validação do sistema gene de interesse/gene de referência, a fim de se verificar se as eficiências de amplificação são semelhantes e próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o gene de referência possa

ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse. A validação consiste na amplificação, tanto com os *primers* do gene de interesse quanto do gene de referência e dos cDNAs de triplicatas de sete concentrações diferentes (diluições seriadas de cinco vezes) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, é construída uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct (*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção). Nessa curva são obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência de um sistema é calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Se as eficiências de amplificação forem semelhantes e próximas a 100% para os genes de referência e de interesse, o sistema está validado. A partir deste dado, é escolhida a concentração de RNA a ser utilizado para a quantificação relativa (expressão).

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

3.9 Análise estatística

A análise estatística para a verificação da diferença na expressão do transcrito da *il1b* foi feito comparando-se o grupo teste com o grupo controle para cada tempo e para cada idade por meio do teste não-paramétrico Mann-Whitney, uma via. O mesmo teste estatístico foi também aplicado para a latência e número de crises. Foram consideradas diferenças significativas quando obtido um $p < 0,05$. As análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism® (Versão 5.0).

3.10 Processamento histológico

Para a análise histológica, quatro animais foram utilizados para o grupo controle e quatro animais para o grupo experimental, 24 horas após o insulto para o cérebro imaturo (larva com sete dpf) e para o cérebro adulto. Os animais adultos e as larvas foram anestesiados por crioanalgesia e os cérebros foram cuidadosamente retirados e colocados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4) por 24 horas. Para eliminar artefatos de congelamento, os espécimes foram crioprottegidos em solução de sacarose 10%, 20% e 30% em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4) permanecendo até afundar em cada concentração e, em seguida, foram congelados em banho-maria gelo seco ou nitrogênio líquido com N-hexano a -30°C . Foram obtidos cortes histológicos com 20 μm de espessura, de orientação transversal, empregando-se o criostato (Leica – modelo CM1100). Os cortes foram recolhidos diretamente sobre lâminas gelatinizadas, coletando-se dois cortes sequenciais, dispostos cada um em uma lâmina diferente. Este procedimento

foi realizado sucessivamente até que se completassem oito cortes por lâmina. Os cortes histológicos seriados foram submetidos a duas técnicas histoquímicas, o cresil violeta e o Fluoro-Jade B (FJ-B) sendo a primeira série submetida à reação histoquímica para FJ-B para a avaliação dos neurônios em degeneração e, a segunda série à coloração de Nissl com cresil violeta para a avaliação da citoarquitetura neuronal.

3.10.1 Histoquímica Cresil Violeta (Nissl)

A marcação com cresil violeta foi utilizada para avaliar a citoarquitetura neuronal do telencéfalo do *zebrafish*. A coloração de Nissl com cresil violeta seguiu o seguinte protocolo: Inicialmente, as lâminas com os cortes obtidos foram imersas em água destilada por 1 minuto, em seguida foram imersas no corante Nissl por 3 segundos e lavados em água destilada em seguida. Após a etapa de lavagem, os cortes foram desidratados através de passagens rápidas em álcool 70%, 80% e 95% e, foram então diafanizados em xilol, e logo em seguida as lâminas foram montadas com Entellan (Merck).

3.10.2 Histoquímica Fluoro-Jade B

Para a marcação para neurônios com FJ-B seguiu-se o protocolo descrito por Schumed e Hopkins (2000). Os cortes foram sequencialmente imersos em NaOH 1% em etanol 80% (5 minutos), etanol 70% (2 minutos) e hidratados em água destilada (2 minutos)

A seguir foram transferidos para uma solução de permanganato de potássio 0,06 % e mantidos por 10 minutos sob agitação constante. Após este procedimento, os cortes foram mergulhados em água destilada (2 minutos) e transferidos para uma solução de FJ-B 0,0004% (20 minutos). Após esta etapa de marcação, os cortes foram mergulhados por 3 vezes em água destilada, durante 1 minuto cada. Logo após a imersão na última água destilada, o excesso de água da lâmina foi retirado com o auxílio de papel absorvente. As lâminas foram transferidas para estufa a 50° C (30 minutos). Por fim, os cortes foram imersos em xilol durante 1 minuto e, logo em seguida, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck).

4. RESULTADOS

4.1. Reprodução e cuidado dos embriões e larvas de *zebrafish*

O sucesso da reprodução e a criação de larvas em nosso laboratório exigiu uma série de adaptações em relação aos procedimentos descritos por Westerfield (2005). Os aquários destinados para a reprodução continham bolas de gude para a proteção dos embriões. Os aquários com maior quantidade de embriões eram aqueles que continham peixes com idade superior a cinco meses de vida. Os embriões eram coletados diariamente por sifonação com o auxílio de uma peneira e permaneciam abrigados em placas de petri contendo água do aquário dentro de uma incubadora até a eclosão das larvas, isto é, entre 48 a 72 horas após a fertilização. Logo após a sua eclosão, as larvas eram transferidas para os aquários de criação de larvas.

A fase larval mostrou ser a fase que exige um cuidado e atenção especial por ser a mais crítica na sobrevivência destes animais em laboratório. Constatamos que as larvas apresentavam a melhor taxa de sobrevivência quando transferidas para um aquário imediatamente após a sua eclosão. Outro ponto importante que notamos ser crucial para a criação das larvas é em relação a sua alimentação. Sabe-se que as larvas começam a se alimentar a partir de cinco dias de vida e que a sua principal fonte de alimentação são os microorganismos, tais como, os paramécios e artêmia (Westerfield, 2005). Portanto, os aquários de criação das larvas eram preparados com antecedência, isto é, antes da transferência das larvas recém-eclodidas, para conter o micro-ambiente para sua alimentação.

4.2. Perfil temporal de expressão do transcrito do gene *il1b* no cérebro imaturo e adulto após indução da crise epiléptica

A avaliação do perfil temporal do transcrito da *il1b* após da indução crise epiléptica apresentou um curto padrão temporal de aumento de expressão no cérebro imaturo e adulto. Para o cérebro imaturo (larvas com sete dpf), este aumento significativo foi observado logo após a indução da crise epiléptica (0.05 h, $p = 0,04$) e 1h após a indução da crise epiléptica no grupo teste (GT) ($p = 0,02$) em comparação com o grupo controle (GC) (figura 4A). A análise estatística revelou que não houve diferença significativa dos níveis de expressão da *il1b* no cérebro imaturo entre os grupos controle (GC) e teste (GT) nos tempos de 6h, 12h, 24h e 48h após a indução da crise epiléptica. Para o cérebro adulto, houve um aumento significativo dos níveis de expressão da *il1b* logo após a indução da crise epiléptica (0.05h; $p = 0,007$) no grupo teste (GT) em comparação com o grupo controle (GC) e não houve diferença significativa entre os grupos controle (GC) e teste (GT) nos tempos 1h, 6h, 12h, 24h e 48h (figura 4B). A média $\pm$ erro padrão da média ($n = 5$) obtidos foram: **(1) Cérebro imaturo:** GC_{0.05h} $1,57 \pm 0,37$ e GT_{0.05h} $2,76 \pm 0,60$ ($p = 0,04$); GC_{1h} $1,44 \pm 0,35$ e GT_{1h} $2,46 \pm 0,17$ ($p = 0,02$); GC_{6h} $2,15 \pm 0,45$ e CT_{6h} $2,55 \pm 0,60$ ($p = 0,26$); GC_{12h} $1,66 \pm 0,16$ e GT_{12h} $1,97 \pm 0,15$ ($p = 0,11$); GC_{24h} $1,55 \pm 0,2$ e GT_{24h} $1,76 \pm 0,45$ ($p = 0,42$); GC_{48h} $1,00 \pm 0,06$ e GT_{48h} $0,93 \pm 0,11$ ($p = 0,27$); **(2) Cérebro adulto:** GC_{0.05h} $0,93 \pm 0,10$; e GT_{0.05h} $1,91 \pm 0,29$ ($p = 0,007$); GC_{1h} $0,96 \pm 0,04$ e GT_{1h} $1,61 \pm 0,23$ ($p = 0,08$); GC_{6h} $1,12 \pm 0,08$ e CT_{6h} $1,41 \pm 0,17$ ($p = 0,27$); GC_{12h} $1,14 \pm 0,12$ e GT_{12h} $1,23 \pm 0,12$ ($p = 0,27$); GC_{24h} $1,53 \pm 0,21$ e GT_{24h} $1,38 \pm 0,13$ ($p = 0,50$); GC_{48h} $0,92 \pm 0,05$ e GT_{48h} $1,07 \pm 0,15$ ($p = 0,42$).

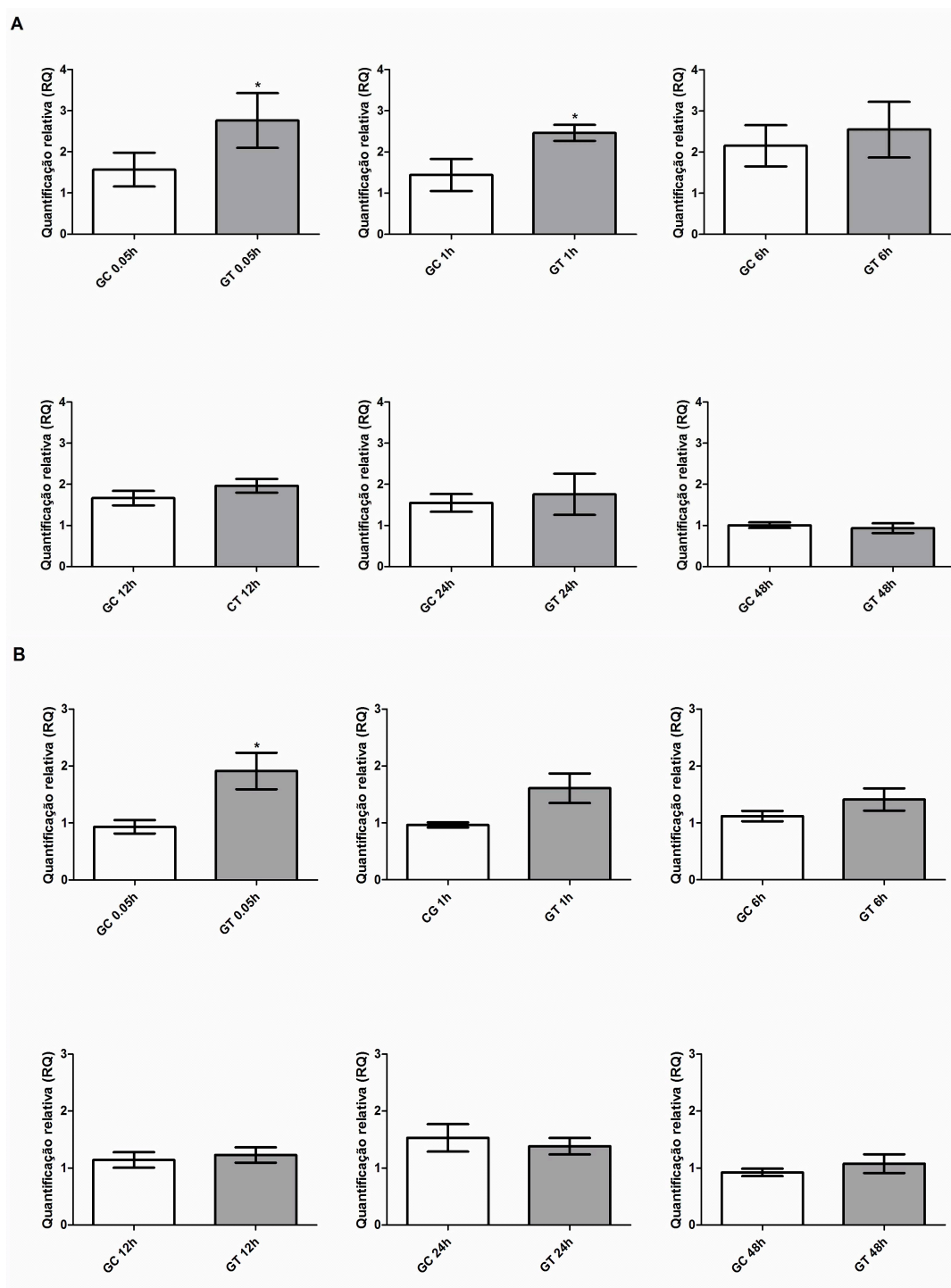


Figura 4: Análise do transcrito do gene *il1b* no cérebro imaturo (A) e adulto (B) após da indução de crise epilética por Pentilenotetrazol (15mM). GC: grupo controle e GT: grupo teste. As barras verticais representam a média $\pm$ erro padrão da média ($p < 0,05$).

4.3. Relação da expressão do transcrito do gene *il1b* com a idade em que é realizada a indução da crise epiléptica no cérebro em desenvolvimento

Evidências experimentais revelaram que há uma relação entre a idade em que é realizada a indução da crise no cérebro em desenvolvimento/imaturo com as consequências moleculares (neuroinflamação) e histopatológicas (gliose e morte neuronal) (Rizzi *et al.*, 2003; Jarvela *et al.*, 2011). A fim de aprofundar o conhecimento sobre as semelhanças do modelo de indução de crise do *zebrafish* com os demais modelos animais para estudos em epilepsia, a indução da crise epiléptica foi realizada em larvas com 15 dpf para avaliar resposta da expressão do transcrito da *il1b* e comprar com a idade de sete dpf. A avaliação do transcrito da *il1b* 1h após da indução crise epiléptica em larvas com 15 dpf apresentou de aumento de expressão no grupo teste (GT) ($p = 0,02$) em comparação com o grupo controle (GC) (figura 5). Embora seja evidente a diferença dos níveis de expressão da *il1b*, após a indução de crises epilépticas nas larvas com 15dpf e sete dpf, essa diferença não foi estatisticamente significativa entre as idades de 15 dpf em relação as larvas com 7 dpf (figura 6). A média $\pm$ erro padrão da média ($n = 5$) obtidos foram: 15 dpf GC_{1h} $1,86 \pm 0,27$ e GT_{1h} $3,63 \pm 0,68$.

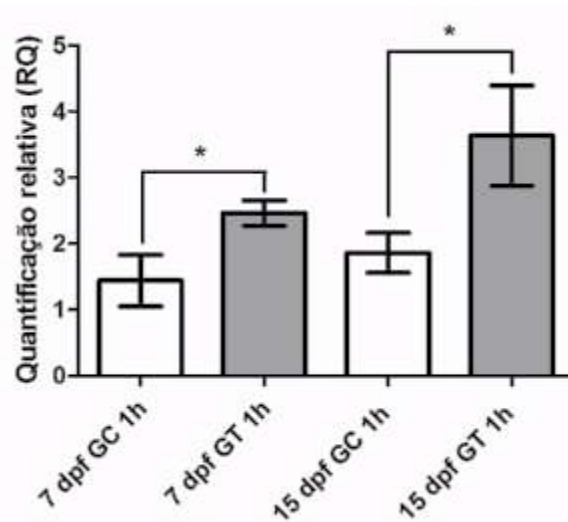


Figura 5: Análise do transcrito do gene *il1b* em larvas com sete dpf e 15 dpf. GC: grupo controle e GT: grupo teste. As barras verticais representam a média $\pm$ erro padrão da média ($p < 0,05$). dpf: dias pós-fertilização.

4.4. Tempo de exposição ao Pentilenotetrazol até a ocorrência da primeira crise epiléptica (latência)

O intervalo de tempo a partir do momento em que as larvas e os animais adultos permaneceram expostos na solução de 15mM de Pentilenotetrazol até a ocorrência da primeira crise epiléptica foi significativamente maior para as larvas com sete dpf em relação as larvas com 15 dpf e o animais adultos (figura 6). Os valores obtidos do tempo da latência para cada idade foram: (i) 7dpf: $2,92 \pm 0,17$ minutos; (ii) 15dpf: $1,50 \pm 0,18$ minutos; e adulto: $1,16 \pm 0,17$ minutos (média $\pm$ E.P.M.; $n = 10$). dpf: dias pós-fertilização

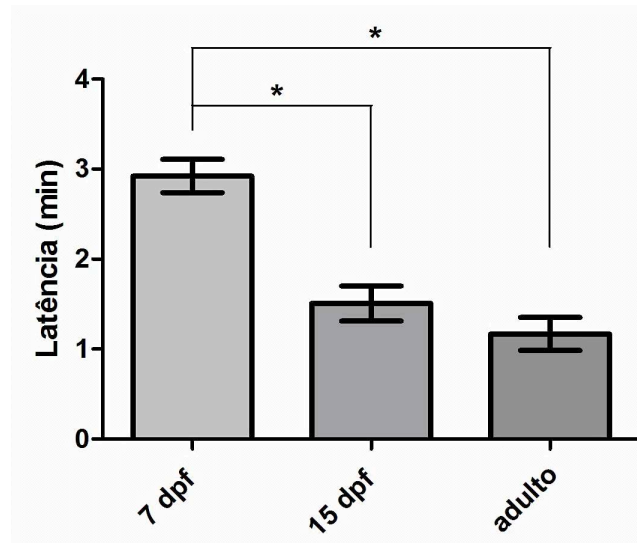


Figura 6: Latência das larvas com 7 dpf, 15 dpf e adulto (n = 10). As barras verticais representam a média $\pm$ erro padrão da média ($p < 0.05$). FJ-B

4.5. Número de crises epiléticas observadas durante o tempo de exposição ao Pentilenotetrazol

O número de crises epiléticas observadas a partir do padrão comportamental característico da crise epilética durante os 20 minutos de exposição ao PTZ para as idades de sete dpf e 15dpf foram: (i) 7dpf: $38,2 \pm 4,5$ e (ii) 15dpf: $5,8 \pm 0,96$ (média $\pm$ E.P.M.; n = 6). As larvas com sete dpf apresentaram maior número de crises (6,5 vezes maior) em relação as larvas com 15dpf (figura 7).

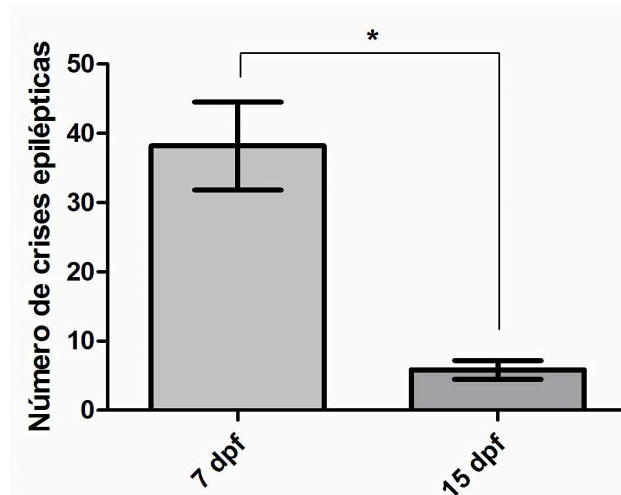


Figura 7: Número de crises epilépticas em larvas com 7 e 15 dpf durante 20 minutos de exposição ao Pentilenotetrazol (15mM; n = 6). As barras verticais representam a média $\pm$ erro padrão da média ($p < 0,05$). dpf: dias pós-fertilização

4.6. Morfologia neuronal do telencéfalo na larva e no zebrafish adulto

O ponto inicial para a análise histológica foi a padronização do congelamento do cérebro do zebrafish para a obtenção de cortes em criostato (*vide* página 26). A marcação com cresil violeta foi realizada para observar a morfologia neuronal (figura 8, 9 e 10) e localizar regiões do *pallium* lateral e *pallium* medial localizadas na região dorsal do telencélafo na larva e no *zebrafish* adulto. Entretanto, devido a indisponibilidade de um atlas mais detalhado para o *zebrafish* (larva e adulto) não foi possível identificar as regiões de interesse. Além disso, a citoarquitetura observada revelou que além de apresentar

diferentes padrões de distribuição neuronal da região rostral para a caudal na larva (figura 11) e no adulto (figura 12), estes padrões de distribuição não são semelhantes entre a larva e o adulto.

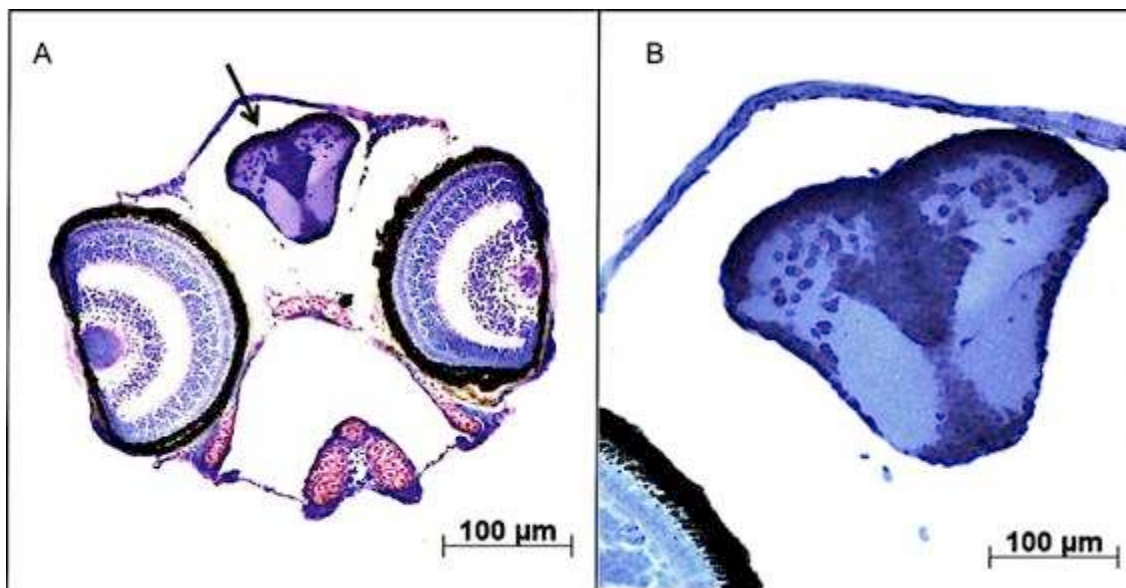


Figura 8: Localização do telencéfalo (seta) na larva de *zebrafish* com sete dias pós-fertilização. Corte transversal do telencéfalo corado com cresil violeta (Nissl) no aumento 10x (A) e 20x (B).

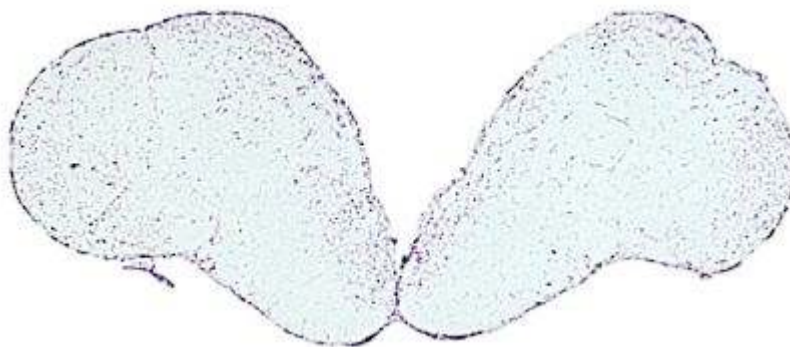


Figura 9: Imagem panorâmica de um corte transversal do telencéfalo do *zebrafish* adulto corado com cresil violeta (Nissl) formada a partir de várias imagens fotografadas no aumento de 10x.

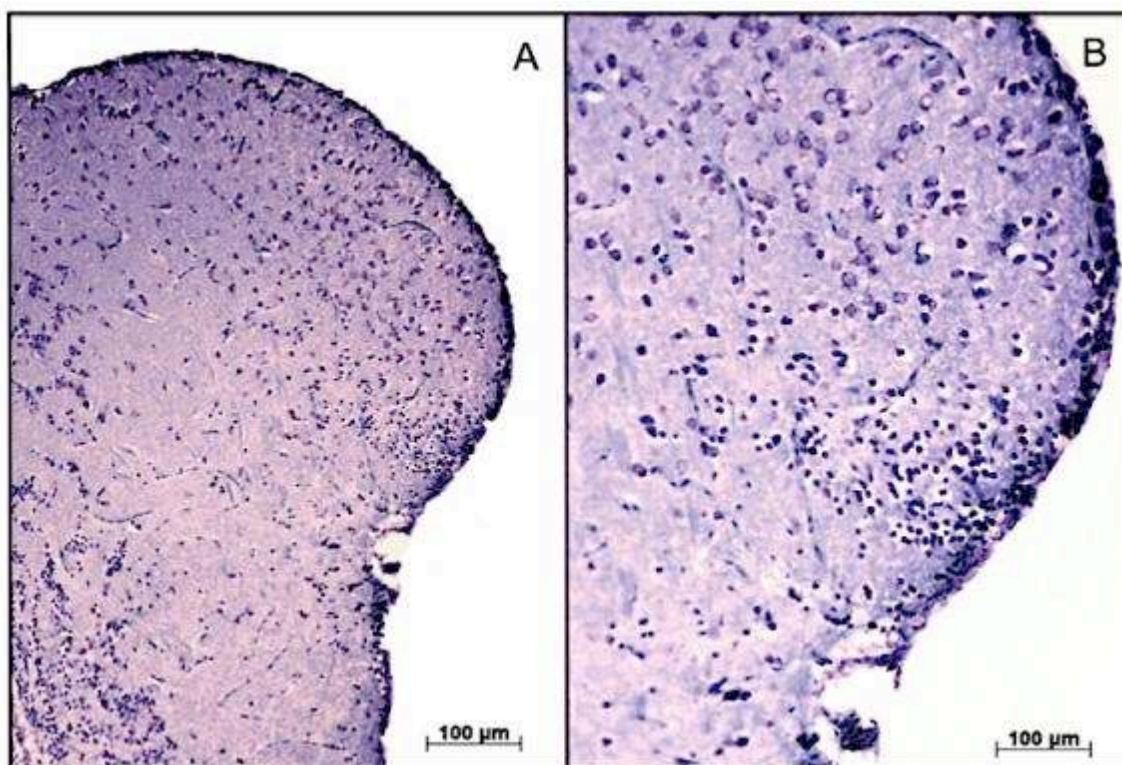


Figura 10: Corte transversal da região dorsal direita do telencéfalo do *zebrafish* adulto corado com cresil violeta (Nissl) fotografadas no aumento de 10x (A) e 20x (B).

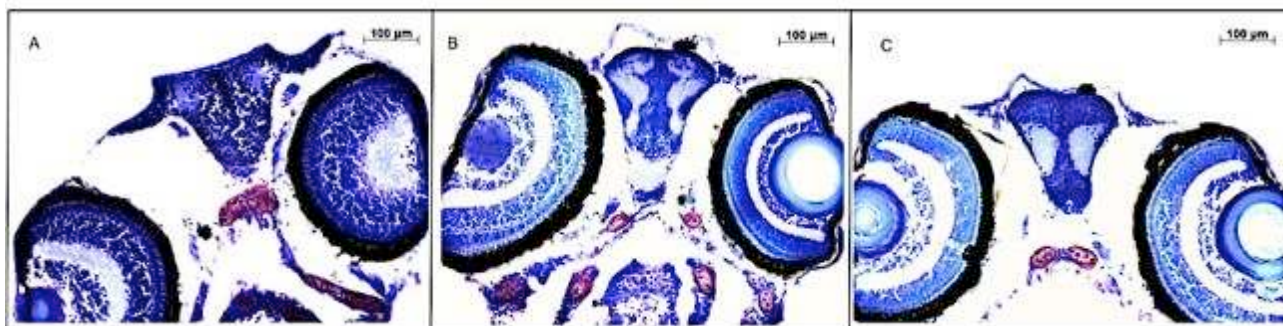


Figura 11: Corte transversal da cabeça de uma larva com sete dias pós-fertilização corado com Cressil Violeta (Nissl) no aumento de 10x. A figura mostra a distribuição neuronal da região rostral para a caudal (A-C).

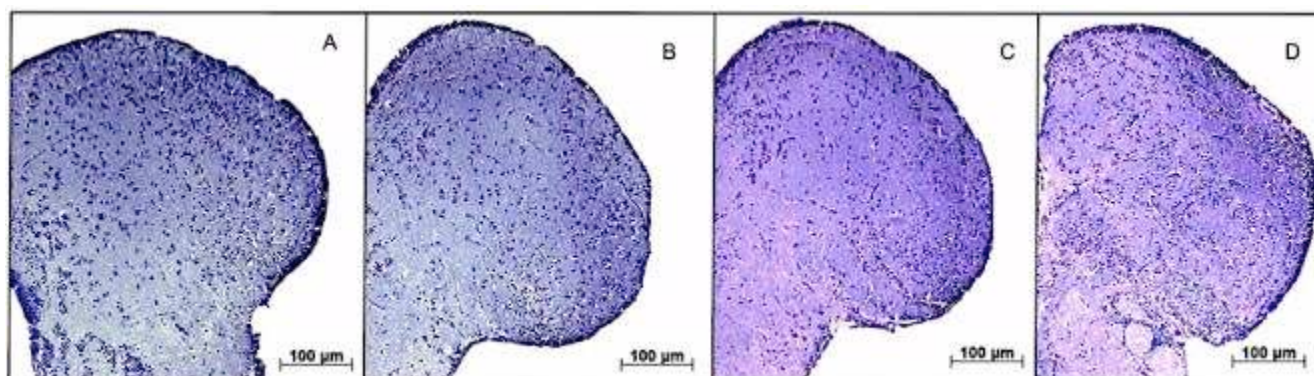


Figura 12: Corte transversal da região dorsal direita do telencéfalo do *zebrafish* adulto corado com Cressil Violeta (Nissl) no aumento de 10x. A figura mostra a distribuição neuronal da região rostral para a caudal (A-D).

4.7. Análise de morte neuronal através da histoquímica do Fluoro-Jade B no cérebro adulto do zebrafish após indução de crise epiléptica por PTZ

A análise de morte neuronal pela histoquímica do FJB foi feita a partir da região dorsal do telencéfalo no cérebro adulto (figura 12). A marcação por FJB não identificou morte neuronal após crise epiléptica de modo inequívoco. Aparentemente, não houve diferença entre os grupos teste e controle embora tenha sido observado uma marcação mais forte pelo FJ-B nos animais do grupo teste (figura 13) em relação ao grupo controle (figura 14). Porém, faz-se necessário um grupo controle positivo para confirmar a intensidade de marcação pelo FJ-B de células positivas.

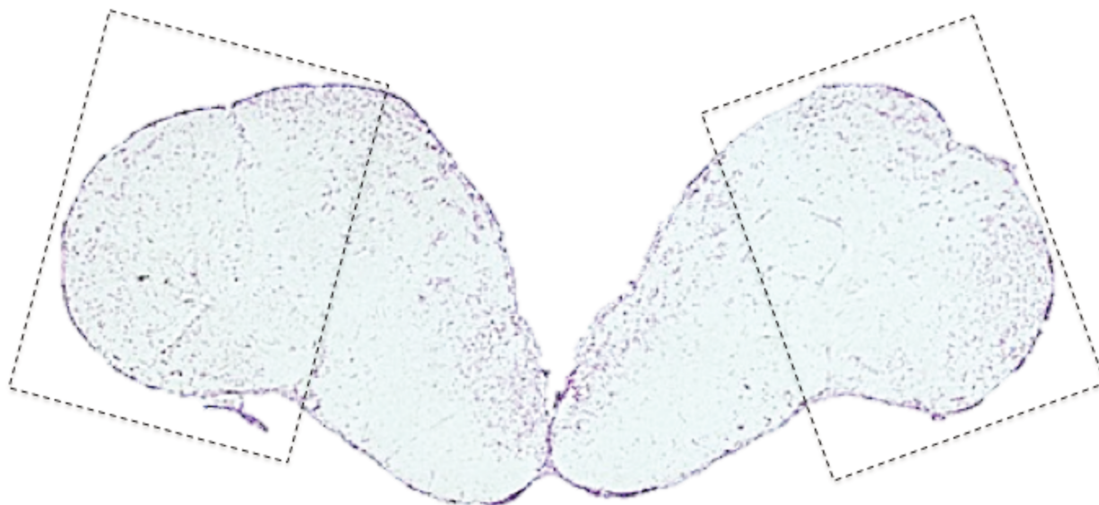


Figura 12: Imagem panorâmica de um corte transversal do telencéfalo do *zebrafish* adulto corado com cresil violeta (Nissl) formada a partir de várias imagens fotografadas no aumento de 10x . A área do quadrado tracejado é a região do pálido dorsal, área de interesse a ser analisada com a histoquímica do Fluoro-Jade B.

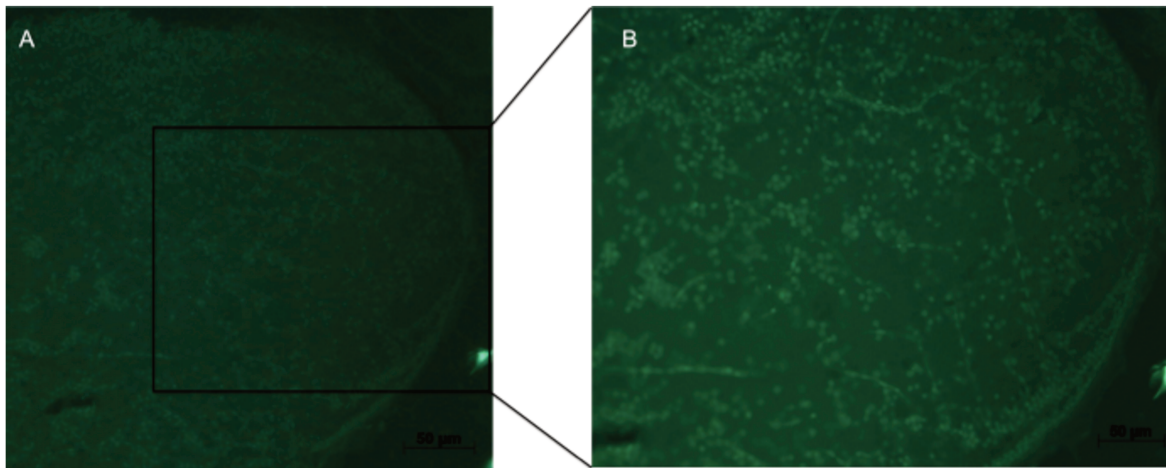


Figura 13: Corte transversal da região dorsal do telencéfalo do *zebrafish* adulto marcado com Fluro-Jade B grupo controle (A: aumento 10x; B: aumento 20x). Barra = 50 µm.

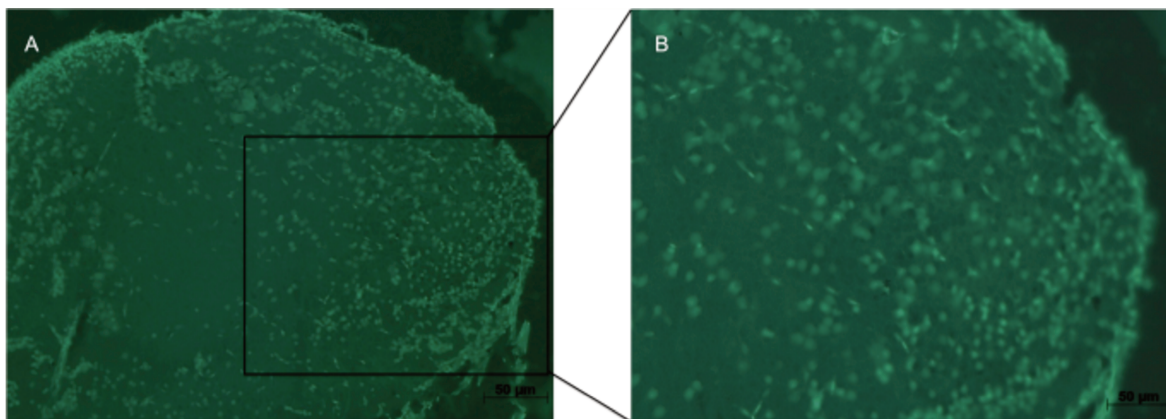


Figura 14: Corte transversal da região dorsal telencéfalo do *zebrafish* adulto marcado com Fluro-Jade B 24h após a indução da crise epiléptica por PTZ (A: aumento 10x; B: aumento 20x). Barra = 50 µm.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o modelo animal *zebrafish* vem atraindo a atenção da comunidade científica, pois, além dessa espécie ser um vertebrado e estar evolutivamente mais próximo aos mamíferos, é um organismo mais simples que possibilita inferir e compreender processos que ocorrem em organismos mais complexos na escala evolutiva. Nesse sentido, esse modelo animal ganhou destaque para os estudos comparativos de neuroanatomia, neurobiologia, resposta imunológica, desenvolvimento embrionário, doenças neurodegenerativas, dentre outros. Na última década, houve um aumento do número de publicações científicas utilizando o *zebrafish* para estudos em epilepsia. Já é conhecido que este modelo apresenta alteração da atividade eletrográfica, comportamental e molecular (*c-fos*) durante a crise epiléptica assim como observados em roedores. Entretanto, é importante ressaltar que a epilepsia é caracterizada por crises espontâneas e recorrentes e, no entanto, o uso do *zebrafish* para estudos em epilepsia se dá pela indução da crise aguda sem recorrência tardiamente⁷. Portanto, este modelo pode ser melhor caracterizado como um modelo de crise *per se*, ao invés de um modelo de epilepsia. Os modelos animais de indução de crise epiléptica são de grande contribuição para as investigações dos mecanismos fisiopatológicos e moleculares durante a epileptogênese. Os roedores são os principais modelos animais utilizados para experimentação e, apesar de conservarem similaridades com as epilepsias humanas, guardam certa dificuldade de manipulação experimental, principalmente quando se trata de manipulações genéticas. Neste sentido, o

⁷ Até o momento não foram descritas na literatura.

zebrafish oferece vantagens (alta taxa de reprodução, reprodução externa, desenvolvimento externo e curto ciclo de vida) que contribuem para a realização de estudos prévios servindo com uma importante ferramenta para complementar e direcionar a investigação *a posteriori* em roedores. Vários trabalhos demonstram o potencial deste modelo para estudos em epilepsia como, por exemplo, silenciamento (*knockdown*) de genes de canais iônicos (Fein *et al.*, 2007; Chege *et al.*, 2012), tratamento da crise epiléptica por estimulação do nervo vago (Pineda *et al.*, 2012), indução de crise por cainato (Alfaro *et al.*, 2011), indução de crise por hipertermia (Hunt *et al.*, 2012), mutagênese em larga escala para identificação de fenótipos resistentes à crise epiléptica (Baraban *et al.*, 2007) e *screening* de DAE (Picher *et al.*, 2003; Kaufman *et al.*, 2009). Além disso, Teng e colaboradores (2010) realizaram o silenciamento (*knockdown*) do gene *leucine-rich glioma inativado 1 (lgil1)* e mostraram que o *zebrafish* é um modelo genético favorável para realizar investigações de genes relacionados com a epilepsia. No entanto, ainda há muito o que ser investigado, principalmente para conhecer melhor esse modelo a fim de verificar se ele também reproduz as alterações histopatológicas e moleculares vistas na epileptogênese que já são bem estabelecidos em outros modelos animais. Neste sentido, o presente trabalho se propôs a investigar dois marcadores de epileptogênese, a neuroinflamação e morte neuronal, após a indução de crise epiléptica por PTZ no cérebro imaturo e adulto de *zebrafish*.

5.1. Reprodução e criação do *zebrafish* em laboratório

Um dos pontos cruciais na realização deste projeto foi a obtenção de embriões para a comparação dos efeitos de crises epiléptica no cérebro imaturo e maduro de *zebrafish*. O

início deste trabalho foi dedicado à manutenção e reprodução dos peixes adultos visando a obtenção de embriões a fim de ser realizada a indução da crise em larvas com sete dpf. A reprodução dessa espécie em laboratório não é um processo simples, pois ela exige conhecimentos de diversos fatores que podem influenciar a sua reprodução, tais como: idade dos animais; densidade (número de peixes/L); porcentagem de macho/fêmeas; pH; níveis de amônia tóxica; dieta e temperatura da água. Todo esse conhecimento já exposto na literatura precisou ser adaptado para as melhores condições de criação dos animais em nosso laboratório.

Após vários meses de adaptações, obtivemos sucesso não só na reprodução como também criação dos novos peixes de forma que hoje, podemos coletar embriões diariamente ou de acordo com a necessidade, tanto para a criação desses animais como para experimentação. Com o sucesso na reprodução dos animais, deu-se início à indução das crises nas larvas com sete dpf e nos animais adultos para a avaliação por RT-qPCT do transcrito da *illb* e a análise histológica por FJB.

5.2. O perfil temporal de expressão do transcrito do gene *illb* após a indução de crise epiléptica por Pentilenotetrazol no cérebro imaturo e adulto no modelo zebrafish

Os resultados do perfil temporal do RNAm da *illb* apresentou um curto padrão temporal de superexpressão (figura 4), semelhante ao observado em roedores. Minami e colaboradores (1990) mostraram que o aumento da atividade neuronal decorrente da crise

epiléptica induzida por PTZ foi capaz de promover um aumento rápido e transitório dos níveis do RNAm do gene da *Il1-b* no hipocampo de ratos adultos. Este aumento foi detectado 30 minutos após a crise epiléptica, retornando ao nível basal de expressão em três horas após a crise epiléptica. Além disso, mostrou que o perfil temporal dos níveis de RNAm do gene da *Il1-b* no hipocampo após a indução do SE por ácido caínico, um composto análogo do neurotransmissor glutamato, foi maior em relação a indução feita por PTZ. O perfil temporal dos níveis de RNAm do gene da *Il1-b* no hipocampo apresentou um aumento de expressão em 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 24h e, não houve diferença em 72h após a indução de crise epiléptica por ácido caínico em ratos adultos. Essa diferença do perfil temporal de transcritos do gene da *Il1-b* após a indução por PTZ e por ácido caínico pode ser devido a diferença entre o mecanismo de ação biológica de cada agente químico convulsivante. Além disso, Jarvela e colaboradores (2011) também mostraram que o perfil temporal do RNAm da *Il1-b* após a indução do SE por ácido caínico em ratos com 21 dias de vida, isto é, no cérebro em desenvolvimento, apresentou aumento significativo em relação ao grupo controle em 4h, 8h e 24h e, não houve diferença em 72h após a indução do SE. Embora o curto padrão temporal de expressão da *il1b* no *zebrafish* seja semelhante aos vistos em roedores, no *zebrafish* este perfil é mais curto provavelmente devido a diferença entre o mecanismo de ação biológica de cada agente químico convulsivante como também, o tipo de indução de crise, isto é, indução de crise epiléptica (*zebrafish*) e indução de SE (roedores).

A ativação da expressão da IL-1 β tem sido relacionada com o produto da ação da ciclooxigenase-2 (COX-2) a prostaglandina E₂ (PGE₂) (Samad *et al.*, 2001; Dinarello, 2002; Ferri e Ferguson, 2005; Sang *et al.*, 2005; Ravizza *et al.*, 2008b; Claycomb *et al.*,

2012). Existem linhas de evidência que relacionam o papel da COX-2 com várias alterações neurológicas, incluindo as epilepsias (Vezzani e Granata, 2005; Dhir *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). As enzimas ciclooxigenases (COXs) são responsáveis pela conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas, mediadores do processo inflamatório, são elas: a COX-1; COX-2; e COX-3 (Oliveira *et al.*, 2008). A ação de cada uma das COXs está associada a uma prostaglandina sintase (PGs) específica, sendo a ação da COX-2 associada à prostaglandina E sintase (PGES) dando origem a PGE₂ (Vezzani e Granata, 2005; Dhir *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008).

A PGE₂ desempenha um papel central na excitabilidade neuronal e na modulação da sinalização sináptica em situações fisiológicas e patológicas (Chen, Magee e Bazan, 2002; Chen e Bazan, 2005; Jung *et al.*, 2005). Estudos clínicos e experimentais mostraram que os níveis de PGE₂ estão aumentados após a ocorrência da crise epiléptica (Loscher e Siemes 1988, Navarro *et al.* 1989; Ravizza *et al.*, 2008b). Trabalhos realizados em modelos animais demonstraram que a diminuição dos níveis de PGE₂, através de inibidores seletivos da COX-2, atenuou a ocorrência de crises espontâneas após indução do SE pela pilocarpina (Jung *et al.*, 2006); aumentou o período de latência após a indução de crise com PTZ, como também atenuou o padrão comportamental e atividade eletrográfica das crises induzidas por PTZ (Oliveira *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009).

O sistema imunológico inato e adaptativo do peixe vertebrado teleósteo *Danio rerio* se assemelha ao de vertebrados superiores em vários aspectos (Trede *et al.*, 2001; Zarkadis *et al.*, 2001). Em relação ao sistema imune inato, o *zebrafish* codifica um gene ortólogo⁸ ao

⁸ Gene ortólogo: gene de espécies distintas que possuem um ancestral em comum e que codificam proteínas correspondentes.

gene da *IL-1 β* , a *il-1b* que possui função análoga aos de mamíferos (Vojtech *et al.*, 2012). A *IL-1 β* nos mamíferos, conforme apresentado anteriormente (*vide* página 9), pode ser regulada em nível de transcrição e processamento pós-transcricional através da clivagem pela enzima caspase-1. Recentemente, Vojtech e colaboradores (2012) mostraram que o *zebrafish* possui duas caspases que clivam a *il-1b*, são elas, a caspase A e caspase B cujo domínio catalítico apresenta 54% e 57% de semelhança com a sequência dos aminoácidos da caspase-1 e da caspase-5 de mamíferos, respectivamente.

Outro fator semelhante entre os sistemas imune inato do *Danio rerio* e de mamíferos é em relação aos TLRs. Todos os TLRs são glicoproteínas integrais de membrana que contêm um domínio Toll/IL-1 (TIR) na parte citoplasmática que inicia a transdução do sinal (Xu *et al.*, 2000). Os genes dos TLRs foram altamente conservados na evolução⁹ e já foram identificadas a presença de TLRs, TIR e proteínas adaptadoras no *zebrafish* (Miejer *et al.*, 2004). Além disso, a presença de genes envolvidos com a regulação da via NF- κ B no *zebrafish* demonstra que essa sinalização foi conservada entre os vertebrados (Chang, Chen e Nie, 2010).

Através da análise comparativa do genoma é possível identificar potenciais genes ortólogos e regiões conservadas em sintenia entre espécies diferentes que possuem um ancestral comum. A comparação de sequências ou alinhamento (*blast*) entre o genoma do *zebrafish* com a dos vertebrados superiores na escala evolutiva identificou sequências altamente homólogas aos genes à COX-1 e COX-2 e todos os domínios estruturais e funcionais dessas enzimas mostraram ser conservados (Grosser *et al.*, 2002; Pini *et al.*,

⁹ Sendo encontrados em *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*.

2003; Ishikawa *et al.*, 2006). Em 2006, Ishikawa e colaboradores identificaram uma segunda isoforma da COX-2, a COX-2b e denominaram a COX-2 já descrita como *cox-2a*. Em seu trabalho foi demonstrado que sequência do gene da *cox-2b* apresenta uma semelhança de 70,5% com a do camundongo, sugerindo que esse é um segundo gene ortólogo aos dos mamíferos. Além disso, as junções éxon-íntron das ciclooxigenases, por serem altamente conservadas entre os mamíferos, também foram analisadas revelando que as junções éxon-íntron do gene da *cox-2b* do *zebrafish* é idêntico com o gene da COX-2 dos mamíferos, apresentando 10 éxons e nove íntrons. A partir da evidência de que a ação da COX-2 e da PGES é regulada coordenadamente originando a PGE₂, Pini e colaboradores (2005) realizaram o silenciamento via morpholino antisense da PGES no *zebrafish* e observaram uma inibição da inflamação. Além disso, observaram que a PGES é coordenadamente regulada com a COX-2 durante a fase de desenvolvimento no processo vascular.

Uma vez que a expressão da COX-2 nos mamíferos é regulada por uma variedade de sinais que incluem citocinas, neurodegeneração, inflamação dentre outros (Grosser *et al.*, 2002; Ishikawa *et al.*, 2006) e, devido ao fato do sistema imunológico inato do *zebrafish* apresentar várias semelhanças com o dos vertebrados superiores (Trede *et al.*, 2001; Zarkadis *et al.*, 2001), daremos continuidade à investigação da expressão dos genes *cox-2a*, *cox-2b*, *pge₂*, caspase A, caspase B e *illr* no *zebrafish* após a crise epiléptica induzida pelo PTZ.

5.3. A relação entre a idade de indução da crise no cérebro em desenvolvimento com a expressão do transcrito do gene *il1b*

Evidências experimentais mostraram que existe uma relação entre a idade em que é realizada a indução da crise epiléptica com as consequências moleculares (neuroinflamação) e histopatológicas (gliose e morte neuronal) (Rizzi *et al.*, 2003; Jarvela *et al.*, 2011). O estudo realizado por Rizzi e colaboradores (2003) observou uma superexpressão do transcrito do gene *Il1-b* quatro horas após a indução do SE por aplicação do ácido caínico em ratos com nove, 15 e 21 dias de vida, isto é, no cérebro em desenvolvimento. Porém, este aumento foi maior nos animais com 21 dias de vida se comparado com aos animais com 15 dias de vida e não houve alteração do nível de expressão em ratos com nove dias de vida. Além disso, essa superexpressão precede a presença de morte neuronal mostrando que não existe uma relação entre a expressão da IL1-B com a ocorrência de lesão neuronal no cérebro imaturo. Jarvela e colaboradores (2011) mostraram também um aumento do RNAm da *Il1-b* após a indução do SE por ácido caínico em ratos com nove e 21 dias de vida porém, a expressão nos ratos com 21 dias de vida foi maior em relação aos ratos com nove dias de vida. Estes dados evidenciam que a diferença dos níveis de RNAm do gene da *Il1-b* no cérebro em desenvolvimento está relacionado com a maturidade do cérebro, mostrando que existe uma relação direta entre a idade em que é realizada a indução da crise com a sua expressão.

A fim de aprofundar o conhecimento sobre as semelhanças do modelo de indução de crise do *zebrafish* com os demais modelos animais para estudos em epilepsia, a indução da crise epiléptica foi também realizada em larvas com 15 dpf para avaliar resposta da

expressão do transcrito da *illb* e comparar com os resultados obtidos da idade de sete dpf. Nossos resultados revelaram um aumento significativo 1h após a indução da crise nas larvas 15dpf em relação ao grupo controle. Embora seja evidente uma diferença dos níveis de expressão da *illb* após a indução da crise nas larvas com 15dpf e sete dpf, essa diferença não foi estatisticamente significativa entre as idades de 15 dpf em relação as larvas com sete dpf (figura 6). Este dado pode ser um indicativo de que existe uma relação entre a idade no cérebro em desenvolvimento do *zebrafish* com a expressão a *illb* assim como o observado no cérebro em desenvolvimento de roedores.

5.4. Latência e número de crises

A análise da latência e o número de crises epiléticas observadas durante os 20 minutos de exposição das larvas ao PTZ foram realizadas para gerar maiores conhecimentos sobre este modelo de indução de crise epilética.

A análise da latência, isto é, o tempo de exposição ao PTZ até a ocorrência da primeira crise epilética foi realizada através da observação do padrão comportamental a partir do contato do animal com o PTZ. Esta análise não foi feita a partir do registro eletrográfico, pois este método não seria o mais indicado para essa finalidade uma vez que o registro pode ser realizado somente na larva imobilizada em agarose e no animal adulto anestesiado, reduzindo assim a absorção de PTZ e aumentando o tempo até a ocorrência da primeira crise (Baraban *et al.*, 2005; Pineda *et al.*, 2011). Este trabalho é o primeiro a analisar a latência em larvas e os nossos resultados revelaram que a latência foi maior nas

larvas com sete dpf se comparado com as larvas de 15 dpf e com os animais adultos expostos à mesma concentração de PTZ (figura 7). O resultado da latência no *zebrafish* adulto foi similar ao previamente descrito por Mussulini e colaboradores (2013). Entretanto, uma vez que estes animais tinham diferentes estágios de desenvolvimento, a diferença da latência entre as idades é provavelmente devido a diferença da absorção do PTZ em cada fase. Sabe-se que *zebrafish* adulto absorve o PTZ a partir da água circundante através das guelras/brânquias (Pineda *et al.*, 2011). No entanto, as larvas com cinco e sete dpf absorvem o PTZ através de pele (respiração cutânea), o que torna mais lenta a absorção PTZ se comparado com adultos (Pineda *et al.*, 2011). Essa poderia ser uma explicação para este achado.

O número de crises epiléticas foi também analisado a partir da observação do padrão comportamental durante a exposição ao PTZ. Entretanto, devido a falta do registro eletrográfico dos cérebros das larvas e do *zebrafish* adulto, o número de crises observadas neste estudo pode representar um valor subestimado, pois é conhecido que as crises epiléticas podem ocorrer sem nenhuma manifestação comportamental como vistos em humanos e em modelos animais de crises de ausência. Porém, o trabalho de Afrikanova e colaboradores (2013) revelaram que a supressão do padrão comportamental pelo uso DAEs correspondia com a inibição da atividade eletrográfica epileptiforme. Neste sentido, nossa análise é válida, pois revelou que as larvas apresentam sucessivos episódios de comportamento característicos de crises epiléticas durante os 20 minutos em que permanecem expostas ao PTZ. Além disso, é interessante notar que o número crises epiléticas nas larvas com sete dpf foi, aproximadamente, seis vezes maior em relação às larvas com 15 dpf (figura 7). Esta análise não foi feita para os animais adultos, pois

diferentemente das larvas, eles não sobrevivem se ficarem muito tempo expostos ao PTZ (Mussulini *et al.*, 2013) e, portanto, os mesmos permanecem em exposição até a ocorrência de uma única crise epiléptica.

A diferença do número de crises epiléticas observadas nestas duas idades no cérebro em desenvolvimento do *zebrafish* foi um dado interessante que nos levou a refletir se poderia existir uma relação entre o número de crises com a expressão da *il1b*. Entretanto, não foi encontrado nenhum trabalho na literatura que fizesse essa associação direta. Sabe-se que os astrócitos e a micróglia são os principais locais de produção da IL-1 β no SNC e que também há uma relação entre a ativação da gliose (micróglia e astrócito) com a idade no cérebro em desenvolvimento após a indução do SE (Rizzi *et al.*, 2003; Jarvela *et al.*, 2011). Com isso, podemos fazer a relação entre o número de crises com a expressão da IL-1B a partir dos estudos encontrados na literatura a respeito do perfil temporal de ativação da gliose reativa. O trabalho de Sarkisian e colaboradores (1997) investigou se, as alterações histopatológicas (morte celular e gliose) e cognitivas após múltiplas aplicações de ácido caínico, isto é, vários SE (várias crises prolongadas) no cérebro em desenvolvimento seria semelhante às consequências observadas no cérebro adulto após uma única aplicação de ácido caínico, ou seja, uma crise prolongada. No entanto, eles observaram que cérebro imaturo é mais resistente ao dano em relação ao adulto mesmo após vários episódios de SE. Nossos resultados mostraram que embora o número de crises das larvas com sete dpf tenha sido maior, os níveis de do transcrito do gene *il1b* foram consideravelmente menores em relação às larvas com 15 dpf. Portanto, baseado nos níveis de transcrito do gene *il1b* e no número de crises, estes dados podem ser um indicativo de que as larvas com sete dpf são mais resistentes à indução de crise epiléptica em relação às larvas com 15 dpf. Além disso,

podemos inferir um papel protetor do gene da *illb* neste modelo uma vez que a os maiores níveis dessa citocina correspondeu a um menor número de crises epiléticas.

5.5. Marcação de morte neuronal por Fluoro-Jade B após indução de crise epilética no cérebro adulto do zebrafish

Nosso trabalho foi o primeiro estudo que buscou investigar a presença de morte neuronal após a indução da crise epilética por PTZ no modelo animal de indução de crise epilética *zebrafish*. A princípio, a avaliação de morte neuronal também seria realizada para cérebro em desenvolvimento do zebrafish (larva com sete dpf), porém, além da dificuldade da localização das regiões de interesse e tendo em vista que em outros modelos animais o cérebro em desenvolvimento é mais resistente à lesão provocada pela indução da crise optou-se pela análise somente no *zebrafish* adulto.

O FJB é um marcador específico de neurônios em degeneração que tem a vantagem de ser tecnicamente simples em relação à técnica do TUNEL e mais confiável para a análise de morte neuronal em relação à coloração de Nissl¹⁰ (Schumed e Hopkins, 2000). Entretanto, nossos resultados não foram conclusivos devido à dificuldade de padronização da marcação de células FJB positivas no cérebro adulto do *zebrafish*. Desta forma, os

¹⁰ A coloração de Nissl é uma técnica convencional que possibilita a observação de alterações morfológicas dos neurônios e, a partir destas alterações, inferir o estado de degeneração dos neurônios. Entretanto, os artefatos de processamento podem produzir falsos positivos (Schumed e Hopkins, 2000).

trabalhos futuros que visam investigar a morte neuronal neste modelo devem ser direcionados para a realização de uma dupla marcação por TUNEL e FJB. Além disso, seria interessante avaliar também a ativação da gliose reativa e neurogênese e neste modelo.

Desta forma, o presente trabalho corresponde ao primeiro estudo dedicado a: (i) descrever o perfil temporal de transcrito do gene *illb* no cérebro imaturo e adulto; (ii) analisar a relação da expressão do transcrito do gene *illb* em diferentes idades no cérebro em desenvolvimento; (iii) investigar o número de crises epiléticas durante a exposição ao PTZ; (iv) registrar a latência na fase larval; e (v) estudar se há morte neuronal no modelo de indução de crise epilética do *zebrafish*. Portanto, estes resultados contribuem para a caracterização deste modelo para estudos em epilepsia.

6. CONCLUSÕES

- O perfil temporal do transcrito do gene *illb* apresentou um curto período de superexpressão no cérebro imaturo e no cérebro adulto do *zebrafish* após a indução de crises epiléticas, mostrando que o *zebrafish* apresenta um padrão temporal de expressão similar ao observado em roedores.
- A diferença dos níveis de expressão da *illb* após a indução da crise nas larvas com 15dpf e sete dpf não foi estatisticamente significante entre as idades.
- A diferença da latência entre as idades é provavelmente devido a diferença da forma de absorção do PTZ de cada estágio de desenvolvimento.
- As larvas apresentam sucessivos episódios de comportamento característicos de crises epiléticas durante os 20 minutos em que permanecem expostas ao PTZ. O número crises epiléticas observadas nas larvas com sete dpf foi, aproximadamente, seis vezes maior em relação às larvas com 15 dpf.
- Embora o número de crises das larvas com sete dpf tenha sido maior, os níveis de expressão do transcrito do gene *illb* foram consideravelmente menores em relação às larvas com 15 dpf. Portanto, baseado nos níveis de transcritos do gene da *illb* e no número de crises, estes dados podem ser um indicativo de que as larvas com sete dpf são mais resistentes à indução da crise epilética em relação às larvas com 15

dpf e com os animais adultos. Assim, podemos inferir um possível papel protetor da *il1b* neste modelo uma vez que a os maiores níveis de transcritos do gene da *il1b* foram relacionados com um menor número de crises epiléticas.

- A histoquímica por FJB não mostrou uma marcação confiável de neurônios em degeneração em cérebro de *zebrafish* após crise epilética.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Alfaro JM, Ripoll-Gómez J, Burgos JS. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. *Eur J Neurosci*. 2011;33(7):1252-5.

Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin- 1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol*. 2005 Aug;5(8):629-40.

Alvestad S, Hammer J, Qu H, Håberg A, Ottersen OP, Sonnewald U.. Reduced astrocytic contribution to the turnover of glutamate, glutamine, and GABA characterizes the latent phase in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2011, 31, 1675–1686.

Baraban SC, Dinday MT, Castro PA, Chege S, Guyenet S, Taylor MR. A Large-scale Mutagenesis Screen to Identify Seizure-resistant Zebrafish. *Epilepsia*. 2007 June; 48(6): 1151–1157.

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

Baram TZ, Eghbal-Ahmadi M, Bender RA. Is neuronal death required for seizure-induced epileptogenesis in the immature brain? *Prog Brain Res*. 2002;135:365-75.

Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD, Johnson SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res*. 2000 Sep;10(9):1351-8.

Barman RP. A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. Record of the zoological survey of India *Ocasional Papers*, 1991, 137, 1-91.

Ben-Ari Y. Exitatory actions of GABA during development: the nature of the nature. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Sep;3(9):728-39.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*. 2010 Apr;51(4):676-85.

Bernardino L, Xapelli S, Silva AP, Jakobsen B, Poulsen FR, Oliveira CR, Vezzani A, Malva JO, Zimmer J. Modulator effects of interleukin 1beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures *J Neurosci*. 2005 Jul 20;25(29):6734-44.

Broglio C, Rodríguez F, Gómez A, Arias JL, Salas C. Selective involvement of the goldfish lateral pallium in spatial memory. *Behav Brain Res*. 2010 Jul 11;210(2):191-201.

Casadei R, Pelleri MC, Vitale L, Facchin F, Lenzi L, Canaider S, Strippoli P, Frabetti F. Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in the zebrafish. *Gene Expr Patterns*. 2011 Mar-Apr;11(3-4):271-6.

Chang MX, Chen WQ, Nie P. Structure and expression pattern of teleost caspase recruitment domain (CARD) containing proteins that are potentially involved in NF-kB signaling. *Developmental and Comparative Immunology* 34, 2010, 1–13.

Chao CC, Hu S, Ehrlich L, Peterson PK.. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav Immun*. 1995 Dec;9(4):355-65.

Chege SW, Hortopan GA, T Dinday M, Baraban SC.. Expression and function of KCNQ channels in larval zebrafish. *Dev Neurobiol*. 2012 Feb;72(2):186-98.

Chen C, Bazan NG. Endogenous PGE2 regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 2002 Jun;87(6):2851-7.

Chen C, Magee JC, Bazan NG. Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J Neurophysiol*. 2002 Jun;87(6):2851-7.

Chen K, Baram TZ, Soltesz I. Febrile seizures in the developing brain result in persistent modification of neuronal excitability in limbic circuits. *Nat Med* 1999;5:888–894.

Clin Perinatol. 2009 December; 36(4): 881.

Dhir A, Naidu PS, Kulkarni SK. Effect of cyclooxygenase inhibitors on pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsions: possible mechanism of action. Prog. Neuropsychopharmacol. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2006 Dec 30;30(8):1478-85.

Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases Clin Exp Rheumatol. 2002 Sep-Oct;20(5 Suppl 27):S1-13.

Dodd A, Curtis PM, Williams LC, Love DR. Zebrafish: bridging the gap between development and disease. Hum Mol Genet. 2000 Oct;9(16):2443-9.

Dooley K, Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease. Curr Opin Genet Dev. 2000 Jun;10(3):252-6.

Driever W, Fishman M. The zebrafish: Heritable disorders in transparent embryos. J Clin Invest. 1996 April 15; 97(8): 1788–1794.

Dubé C, Richichi C, Bender RA, Chung G, Litt B, Baram TZ. Temporal lobe epilepsy after experimental prolonged febrile seizures: prospective analysis. Brain. 2006 April; 129(Pt 4): 911–922.

Durán E, Ocaña FM, Broglio C, Rodríguez F, Salas C. Lateral but not medial telencephalic pallium ablation impairs the use of goldfish spatial allocentric strategies in a “hole-board” task. Behav Brain Res. 2010 Dec 25;214(2):480-7.

Engeszer RE, Patterson LB, Rao AA, Parichy DM. Zebrafish in the Wild: a Review of Natural History and New Notes from the Field. Zebrafish. 2007 Spring;4(1):21-40.

Fein AJ, Meadows LS, Chen C, Slat EA, Isom LL. Cloning and expression of a zebrafish SCN1B ortholog and identification of a species-specific splice variant. BMC Genomics, 2007, 10;8:226.

Ferri CC, Ferguson AV. Prostaglandin E2 mediates cellular effects of interleukin-1beta on parvocellular neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. J Neuroendocrinol. 2005 Aug;17(8):498-508.

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

Foster AC, Kemp JA. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics Curr Opin Pharmacol. 2006 Feb;6(1):7-17.

Frances E, Jensen, MD. Neonatal Seizures: An Update on Mechanisms and Management. Clin Perinatol. 2009 December; 36(4): 881.

Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M. GABA Itself Promotes the Developmental Switch of Neuronal GABAergic Responses from Excitation to Inhibition. Cell. 2001 May 18;105(4):521-32.

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

Gitai D, Romcy R, Gita, G, Leite J.P, Garcia-Cairasco, N, Paço-Larson ML. Genes e Epilepsia I: epilepsia e alterações genéticas. Rev Assoc Med Bras 2008; 54(3): 272-8.

Grosser T, Yusuff S, Cheskis E, Pack MA, FitzGerald GA. Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jun 11;99(12):8418-23.

Guedes FA, Galvis-Alonso O, Leite JP. Plasticidade Neuronal Associada à Epilepsia do Lobo Temporal Mesial: insights a partir de estudos em humanos e em modelos animais. Journal of epilepsy and clinical neurophysiology (2006) 12; 10-17.

Heida J, Moshé SL, Pittman QJ. The role of interleukin-1 β in febrile seizures. Brain Dev. 2009 May; 31(5): 388–393.

Holmes GL, Ben-Ari Y. Seizure in the developing brain: Perhaps not so benign after all. Neuron. 1998 Dec;21(6):1231-4.

Hortopan GA, Dinday MT, Baraban SC. Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy. Dis Model Mech. 2010 Mar-Apr;3(3-4):144-8.

Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, *et al*. The zebrafish reference

genome sequence and its relationship to human genome. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):498-503.

Hu S, Peterson PK, Chao CC. Cytokine-mediated neuronal apoptosis. *Neurochem Int*. 1997 Apr-May;30(4-5):427-31.

Hu S, Sheng WS, Ehrlich LC, Peterson PK, Chao CC. Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. *Neuroimmunomodulation*. 2000;7(3):153-9.

Huang RQ, Bell-Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH. Pentylentetrazole-Induced Inhibition of Recombinant γ -Aminobutyric Acid Type A (GABA_A) Receptors: Mechanism and Site of Action. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Sep;298(3):986-95.

Hunt RF, Hortopan GA, Gillespie A, Baraban SC. A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Exp Neurol*. 2012 Sep;237(1):199-206.

Ishikawa TO, Griffin KJ, Banerjee U, Herschman HR. The zebrafish genome contains two inducible, functional cyclooxygenase-2 genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jan 5;352(1):181-7.

Jung KH, Chu K, Lee ST, Kim J, Sinn DI, Kim JM, Park DK, Lee JJ, Kim SU, Kim M, Lee SK, Roh JK. Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis*. 2006 Aug;23(2):237-46.

Kaufman CK, White RM, Zon L. Chemical genetic screening in the zebrafish embryo. *Nat Protoc*. 2009;4(10):1422-32.

Key B, Devine CA. Zebrafish as an experimental model: strategies for developmental and molecular neurobiology studies. *Methods Cell Sci*. 2003;25(1-2):1-6.

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF.. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev Dyn*. 1995 Jul;203(3):253-310.

Kobayashi E, D'Agostino MD, Lopes-Cendes I, Andermann E, Dubeau F, Guerreiro CA, Schenka AA, Queiroz LS, Olivier A, Cendes F, Andermann F. Outcome of surgical treatment in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2003, 44(8):1080-4.

Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, Moshé SL, Perucca E, Wiebe S, French J. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 2010 Jun;51(6):1069-77.

Lado FA, Laureta EC, Moshé SL. Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain. *Epileptic Disord*. 2002 Jun;4(2):83-97.

Lado FA, Sankar R, Lowenstein D, Moshé SL. Age-dependent consequences of seizures: relationship to seizure frequency, brain damage and circuitry reorganization. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2000;6(4):242-52.

Lawrence, Christian. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquiculture*, 2007, 269:1-20.

Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*. 1990 Winter;14(4):511-7.

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

Löschner W, Siemes H. Increased concentration of prostaglandin E-2 in cerebrospinal fluid of children with febrile convulsions. *Epilepsia*. 1988 May-Jun;29(3):307-10.

Ma C. Animal models of disease. *Modern Drug Discovery*, 2004, 7(6):30-36.

Maroso M, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Bianchi ME, Vezzani A. Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signalling in epilepsy: the importance of IL-1beta and high-mobility group box 1. *J Intern Med*. 2011 Oct;270(4):319-26.

Mathern GW, Cifuentes F, Leite JP, Pretorius JK, Babb TL. Hippocampal EEG excitability and chronic spontaneous seizures are associated with aberrant synaptic reorganization in the rat intrahippocampal kainate model. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1993 Nov;87(5):326-39.

McCurley AT, 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

Mello LE, Cavaleiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*. 1993 Nov-Dec;34(6):985-95.

Navarro E, Romero SD, Yaksh TL. CNS stimulation and PGE2 release. III. Pentamethylenetetrazole-induced seizures. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1989 Apr;9(2):180-6.

Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Mello CF. Modulation of pentylenetetrazole-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. *Neuroscience*. 2008 Apr 9;152(4):1110-8.

Oliveira MS, Furian AF, Royes LF, Figuera MR, Fiorenza NG, Castelli M, Machado P, Bohrer D, Veiga M, Ferreira J, Cavaleiro EA, Mello CF. Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res*. 2008 Mar;79(1):14-21.

Pascoal, Vinícius D'ávila Bitencourt. O papel da interleucina-1 beta na fase aguda do modelo de epilepsia do lobo temporal induzido pela pilocarpina. Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica. 2010. 116f. Tese (doutorado). Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000777506&opt=3>> Acesso em: 02 setembro 2012.

Pernot F, Heinrich C, Barbier L, Peinnequin A, Carpentier P, Dhote F, Baille V, Beaup C, Depaulis A, Dorandeu F. Inflammatory changes during epileptogenesis and spontaneous seizures in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2011 Dec;52(12):2315-25.

Petroff OA. GABA and Glutamate in the Human Brain. *Neuroscientist*. 2002 Dec;8(6):562-73.

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

Pineda R, Beattie CE, Hall CW. Recording the adult zebrafish cerebral field potential during pentylenetetrazole seizures. *J Neurosci Methods*. 2011 Aug 30;200(1):20-8.

Pini B, Grosser T, Lawson JA, Price TS, Pack MA, FitzGerald GA. Prostaglandin E Synthases in Zebrafish. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Feb;25(2):315-20.

Pitkänen A, Immonen RJ, Gröhn OH, Kharatishvili I. From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: What animal models tell us about the process and treatment options. *Epilepsia*. 2009 Feb;50 Suppl 2:21-9.

Pitkänen A, Kharatishvili I, Karhunen H, Lukasiuk K, Immonen R, Nairismägi J, Gröhn O, Nissinen J. Epileptogenesis in Experimental Models. *Epilepsia*. 2007;48 Suppl 2:13-20.

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

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

Pitkänen A. Therapeutic approaches to epileptogenesis - Hope on the horizon. *Epilepsia*. 2010 Jul;51 Suppl 3:2-17.

Poirier JL, Capek R, De Koninck Y. Differential progression of dark neuron and fluoro-Jade labeling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience*. 2000;97(1):59-68.

Portavella M, Vargas JP. Emotional and spatial learning in goldfish is dependent on different telencephalic pallial systems. *Eur J Neurosci*. 2005 May;21(10):2800-6.

Rakhade SN, Jensen FE. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nat Rev Neurol*. 2009 Jul;5(7):380-91.

Ravizza T, Gagliardi B, Noé F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2008 Jan;29(1):142-60.

Ravizza T, Noé F, Zardoni D, Vaghi V, Sifringer M, Vezzani A. Interleukin Converting Enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL-1 β production. *Neurobiol Dis.* 2008 Sep;31(3):327-33.

Rijkers K, Majoie HJ, Hoogland G, Kenis G, De Baets M, Vles JS. The role of interleukin-1 in seizures and epilepsy: a critical review. *Exp Neurol.* 2009 Apr;216(2):258-71.

Rizzi, M.; Prego, C.; Aliprandi, M.; Richichi, C.; Ravizza, T.; Colella, D.; Veliskova, K.; Moshé, S. Simioni, M.G.; Vezzani, A. Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development. *Neurobiol. Dis.* 14, 2003, 494–503.

Rodríguez F, López JC, Vargas JP, Broglio C, Gómez Y, Salas C. Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish. *Brain Res Bull.* 2002 Feb-Mar 1;57(3-4):499-503.

Salas C, Broglio C, Durán E, Gómez A, Ocaña FM, Jiménez-Moya F, Rodríguez F. Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. *Zebrafish.* 2006;3(2):157-71.

Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ. Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature.* 2001 Mar 22;410(6827):471-5.

Sang N, Zhang J, Marcheselli V, Bazan NG, Chen C. Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. *J Neurosci.* 2005 Oct 26;25(43):9858-70.

Schneider A, Santos J, Porawski M, Schaefer P, Maurer R, Matte U, Silveira T. Implementação de um novo modelo de experimentação animal – zebrafish. *Revista Hospital das Clínicas de Porto Alegre*, 2009, 29(2):100-103.

Schumed LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Research*, 874: 123-130, 2000.

Shin JT, Fishman MC. From zebrafish to human: modular medical models. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;3:311-40.

Silva, Alexandre Vallota e Cavalheiro, Esper Abrão. Epilepsia: Uma janela para o cérebro. MultiCiência, 01 out. 2004. Disponível em: http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_03/a_05_.pdf Acesso em 02 fev. 2011.

Stein C, Caccamo M, Laird G, Leptin M. Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome Biol.* 2007;8(11):R251.

Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb WC, Love DR. Validation of zebrafish reference genes for quantitative real time RT PCR normalization. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2007;39(5):384-90.

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

Vargas JP, López JC, Portavella M. What are the functions of fish brain pallium? *Brain Res Bull.* 2009 Aug 14;79(6):436-40.

Vargas R, Jóhannesdóttir IT, Sigurgeirsson B, Thorsteinsson H, Karlsson KA. The zebrafish brain in research and teaching: a simple in vivo and in vitro model for the study of spontaneous neural activity. *Adv Physiol Educ.* 2011 Jun;35(2):188-96.

Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behav Immun.* 2008 Aug;22(6):797-803.

Vezzani A, Baram TZ. New roles for interleukin-1 Beta in the mechanisms of epilepsy. *Epilepsy Curr.* 2007 Mar-Apr;7(2):45-50.

Vezzani A, Friedman A. Brain inflammation as a biomarker in epilepsy. *Biomark Med.* 2011 Oct;5(5):607-14.

Vezzani A, Granata T. Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence. *Epilepsia.* 2005 Nov;46(11):1724-43.

Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, Binaglia M, Corsini E, Di Luca M, Galli CL, Marinovich M.. Interleukin-1beta enhances NMDA

receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci.* 2003 Sep 24;23(25):8692-700.

Vojtech LN, Scharping N, Woodson JC, Hansen JD. Roles of Inflammatory Caspases during Processing of Zebrafish Interleukin-1B in *Francisella noatunensis* Infection. *Infect Immun.* 2012 Aug;80(8):2878-85.

Wang S, Cheng Q, Malik S, Yang J. Interleukin-1beta inhibits gamma- aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor current in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Feb;292(2):497-504.

Wasterlain CG, Niquet J, Thompson KW, Baldwin R, Liu H, Sankar R, Mazarati AM, Naylor D, Katsumori H, Suchomelova L, Shirasaka Y. Seizure-induced neuronal death in the immature brain. *Prog Brain Res.* 2002;135:335-53.

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

World Health Organization (WHO): Epilepsy. Jan. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html>>. Acesso em: 02 jul. 2012.

Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature.* 2000 Nov 2;408(6808):111-5.

8. ANEXO

Anexo 1: Parecer do comitê de ética em pesquisa.



CEUA/Unicamp

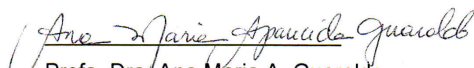
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

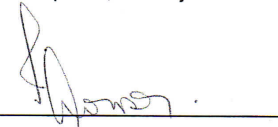
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Investigação de marcadores de epileptogênese em modelo animal do zebrafish" (protocolo nº 2445-1), sob a responsabilidade de Prof. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli / Patrícia Gonçalves Barbalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 06 de junho de 2011.

Campinas, 06 de junho de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva