

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE CRISES EPILÉPTICAS E DOS
EFEITOS COMPORTAMENTAIS INDUZIDOS POR PILOCARPINA EM
PEIXE-ZEBRA ADULTO**

CHARLES BUDASZEWSKI PINTO

PORTO ALEGRE, MAIO DE 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE CRISES EPILÉPTICAS E DOS
EFEITOS COMPORTAMENTAIS INDUZIDOS POR PILOCARPINA EM
PEIXE-ZEBRA ADULTO**

ALUNO: CHARLES BUDASZEWSKI PINTO

ORIENTADOR: PROF. DIOGO LÖSCH DE OLIVEIRA

**Dissertação apresentada ao programa de
pós-graduação em ciências biológicas:
bioquímica, como requisito para
obtenção do grau de mestre em
Ciências Biológicas: Bioquímica.**

PORTO ALEGRE, MAIO DE 2015.

CIP - Catalogação na Publicação

Budaszewski Pinto, Charles

Caracterização do Perfil de Crises Epilépticas e dos Efeitos Comportamentais Induzidos por Pilocarpina em Peixe-Zebra Adulto. / Charles Budaszewski Pinto. -- 2015.

58 f.

Orientador: Diogo Losch de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Epilepsia. 2. Crise epiléptica. 3. Peixe-zebra. 4. Pilocarpina. 5. Comportamento. I. Losch de Oliveira, Diogo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurociências Celulare Molecular do Departamento de Bioquímica Tuiskon Dick do Instituto de Ciência Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi financiado pelo Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Pró-Reitoria de Pesquisa da UFRGS (PROPESQ/UFRGS).

AGRADECIMENTOS

A minha família e amigos de longa data por todo apoio e incentivo ao longo desta jornada.

Aos meus queridos colegas de laboratório, que ao longo destes anos se tornaram grandes amigos. Por todo conhecimento que me transmitiram e por muita diversão que tivemos nos inesquecíveis churrascos e amigos secretos do laboratório.

A minha namorada, Liana Marengo, por ser uma grande companheira, por sempre me apoiar nas minhas escolhas, me ajudar nos momentos mais complicados e por sempre estar presente tanto nos bons como nos maus momentos.

Ao meu orientador, Prof. Diogo Losch de Oliveira, que me abriu as portas do seu laboratório e me proporcionou o contato com este novo e maravilhoso modelo animal, o zebrafish.

A todos professores do departamento que com grande sabedoria e paciência me ensinaram muito do que eu sei hoje e que me levou a realização do mestrado.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pela competência e profissionalismo.

SUMÁRIO

PARTE I	7
RESUMO	8
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
INTRODUÇÃO	12
1.1 Epilepsias	12
1.2 Epilepsia do Lobo Temporal	14
1.3 Modelos Animais de Epilepsia do Lobo Temporal	16
1.4 Peixe-Zebra	18
OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos	23
PARTE II	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Indução de crise epiléptica.....	25
3.3 Avaliação do perfil da atividade exploratória e locomotora.....	26
3.4 Análise Estatística.....	27
RESULTADOS.....	28
PARTE III	32
DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	39
ANEXO.....	40
LEGENDAS DAS FIGURAS.....	40
FIGURAS	42
REFERÊNCIAS	47

PARTE I

RESUMO

Epilepsia é um grupo de desordens neurológicas caracterizada por crises epiléticas recorrentes não provocadas, afligindo 50 milhões de pessoas no mundo. Embora grande parte dos casos possa ser controlada através de medicação um número significativo de pacientes torna-se refratários apesar do tratamento com drogas anticonvulsivantes. Apesar do desenvolvimento bem-sucedido de várias novas drogas antiepiléticas, a busca por novas terapias com maior eficácia e tolerabilidade ainda permanece um objetivo importante. O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina tem sido amplamente utilizado em roedores para o estudo da patogênese da epilepsia do lobo temporal. Embora estes estudos com modelos animais tenham aumentado nossa compreensão das bases patológicas da epilepsia, os complexos mecanismos epileptogênicos e a geração de crises epiléticas ainda não foram completamente elucidados. Ultimamente, foram desenvolvidos estudos avaliando as características comportamentais de peixe-zebra e peixe-zebra (*Danio rerio*). Esse vertebrado é um modelo experimental que vem se consolidando em áreas da ciência por ter características bastante atrativas como pequeno custo e espaço requerido para manutenção, homologia genética e anatômica tornando-se de grande valia para uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos nas crises epiléticas. A partir disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar e caracterizar comportamentalmente as crises epiléticas induzidas por pilocarpina em peixe-zebra adulto. Para isso, os animais foram pré-tratados com uma curva de concentrações de pilocarpina nas doses de 150, 200, 300, 350 e 400 mg/Kg e filmados por 30 minutos. Com a maior dose foi observado um perfil claro de crise tônico-clônica. O uso do anticonvulsivo escopolamina na dose de 1mg/Kg,

ip, 30 minutos antes da aplicação de PILO na maior concentração 400mg/Kg mostrou-se capaz de prevenir a crise tônico-clônica –induzida pela PILO. A avaliação comportamental pós-crise foi realizada no aparato *open-tank* três dias após a crise quando os animais foram filmados por 6 minutos. Foram analisados distância percorrida, tempo móvel, tempo no topo e tempo no fundo. Os resultados deste estudo permitiram uma caracterização temporal das manifestações comportamentais das crises eplépticas em peixe-zebra adulto induzidas por diferentes concentrações de pilocarpina.

ABSTRACT

Epilepsy is a group of neurological disorders characterized by recurrent seizures. It affects about 50 million people worldwide, therefore a public health problem of great importance. While most cases can be controlled through medication, a significant number of patients continue to have seizures despite treatment with anticonvulsant drugs. Despite the successful development of several new antiepileptic drugs, the search for new and more effective therapies and greater tolerability remains an important goal. The pilocarpine model has been extensively used in rodents for the study of neural molecular cascades and mechanisms involved in the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. Although studies with animal models have increased our understanding of the pathological bases of epilepsy, the epileptogenic complex mechanisms and the generation of epileptic seizures have not yet been fully elucidated. Lately, studies evaluating behavioral characteristics of zebrafish (*Danio rerio*) were developed. This vertebrate is an experimental model that has been consolidated in various areas of science for having very attractive features as small cost and space requirements for maintenance, rapid development and life cycle, large offspring, translucent embryos and susceptibility to manipulation and microinjection. Hence, the use of new models becomes of huge value to a greater understanding of the mechanisms involved in this pathology and thus the zebrafish emerges as a complementary alternative for the study of seizures and epilepsy. This study aimed to evaluate and characterize the seizures induced by pilocarpine in adult zebrafish. First, animals were treated with a pilocarpine at different concentrations (150, 200, 300 and 400 mg/kg) and filmed for 30 minutes. Tonic-clonic seizures were observed in the higher dose. When scopolamine, an anticholinergic anticonvulsant, was injected 30 minutes before the higher dose treatment, the pilocarpine-induced seizure was prevented. The post seizure behavioral evaluation was performed in the open-tank apparatus three days after injection and filmed for 6 minutes. Measures analyzed in open-tank were distance traveled, moving time and time at the top and in the background. Taken together, our results allowed a temporal characterization of the seizures behavioral manifestations induced by different concentrations of pilocarpine in adult zebrafish.

LISTA DE ABREVIATURAS

AVC: acidente vascular cerebral

WHO: World Health Organization

AC: ácido caínico

EEG: eletroencefalograma

I.P: intraperitoneal

M1: receptor colinérgico muscarínico tipo 1

NMDA: N-metil D-aspartato

PTZ: pentilenotetrazol

PILO: pilocarpina

SNC: sistema nervoso central

INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsias

As epilepsias referem-se a um grupo etiológica e clinicamente diverso, de transtornos neurológicos caracterizados por crises epiléticas recorrentes, as quais resultam da atividade neuronal excessiva, anormal e hipersincrônica (Engel, 2001). Trata-se de uma disfunção cerebral caracterizada clinicamente por alterações subjetivas ou comportamentais súbitas (crises epiléticas), com tendência a se repetirem por toda a vida do paciente (Nabbout and Dulac, 2008).

A epilepsia é uma dos distúrbios neurológicos mais frequentes atingindo, segundo a World Health Organization (WHO), aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo (Organization, 2012; Sander, 2003). As taxas de incidência e prevalência em países desenvolvidos são de 50 casos por 100.000 habitantes e 700 casos a cada 100.000 habitantes, respectivamente. Esses dados são geralmente muito mais altos em países em desenvolvimento. Segundo a WHO, 80% dos casos são encontrados em países de baixa e média renda (Organization, 2012; Thurman et al., 2011), sendo, portanto, um problema de saúde pública de grande importância.

Embora grande parte dos casos possa ser controlada através de medicação, um número significativo de pacientes torna-se refratários, ou seja, torna-se resistente aos medicamentos, continuando a ter crises apesar do tratamento com as drogas anticonvulsivantes. Todos pacientes com epilepsia, tanto controlada quanto refratária, tem que lidar não somente com as crises epiléticas, mas também com muitas outras comorbidades médicas que podem

estar associadas com a epilepsia. Durante o curso da epilepsia, quase todos os pacientes experienciam alguma condição médica como depressão, ansiedade ou psicose (Hermann et al., 2000). A maior prevalência para depressão ocorre para pacientes com epilepsia com origem no lobo frontal e temporal, principalmente entre pacientes com crises epiléticas não controladas (Victoroff et al., 1994). Pacientes com epilepsia possuem entre 3 a 7 vezes maior incidência de depressão, e muitos relatos tem proposto a depressão também como um fator de risco significativo para a primeira crise epilética não provocada (Hesdorffer et al., 2000). Além disso, estes pacientes também possuem o dobro de chance de desenvolver epilepsia refratária (Hitiris et al., 2007). Além das desordens psiquiátricas, muitos pacientes com epilepsia apresentam um baixo desempenho cognitivo (Motamedi and Meador, 2003).

As epilepsias podem ser classificadas etiologicamente em idiopáticas, sintomáticas ou criptogênicas. As idiopáticas geralmente surgem de anormalidades genéticas que levam a alterações neuronais. Não há lesão cerebral estrutural ou outros sintomas neurológicos relacionados. Epilepsias sintomáticas (ou adquiridas) resultam dos efeitos de uma ou mais lesões patológicas identificáveis, ou um defeito no metabolismo causando lesão generalizada ao cérebro (Engel, 1996; Engel, 2001). Os fatores de risco mais comuns são doença cerebrovascular, tumores cerebrais, alcoolismo, lesões traumáticas da cabeça, malformações no desenvolvimento cortical, herança genética e infecções do sistema nervoso central (Scorza et al., 2009). Epilepsias criptogênicas envolvem condições etiológicas difíceis ou impossíveis de serem determinadas durante a avaliação e não há suspeitas de causas genéticas (Engel, 1996; Engel, 2001).

As crises epilépticas podem ainda ser classificadas de acordo com a região cerebral afetada. As crises epilépticas generalizadas afetam ambos os hemisférios cerebrais, visto que as crises focais afetam parte de um dos hemisférios ou parte de um dos lobos cerebrais. (Centre, 2012; Engel, 2001).

As crises generalizadas induzem uma perda de consciência e causam alterações na atividade elétrica total ou pelo menos uma grande parte do cérebro. Aproximadamente 90% dos pacientes com epilepsia sofrem de crises epilépticas generalizadas do tipo tônico-clônicas e muitos apresentam formas múltiplas desta desordem. Além disso, aproximadamente 30% dos pacientes com epilepsia são refratários aos tratamentos farmacológicos disponíveis (Caulder et al., 2014; Scorza et al., 2009).

O cérebro é dividido em dois hemisférios, cada um consistindo de cinco lobos - o frontal, temporal, parietal, occipital e o lobo da ínsula. Os sintomas das crises focais variam de acordo com o lobo afetado. A epilepsia do lobo temporal é a forma mais comum de epilepsia na população adulta, sendo responsável por 40% dos casos (Gastaut et al., 1975; Lowe et al., 1998). Sua importância clínica decorre não somente de sua elevada prevalência, mas também por ser refratária a maioria dos tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente (Puttachary et al., 2015).

1.2 Epilepsia do Lobo Temporal

Dentre as síndromes epilépticas refratárias, a epilepsia do lobo temporal destaca-se por ser a mais frequente em pacientes adultos, sendo que, neste

caso, a remoção cirúrgica do foco epiléptico torna-se a única alternativa de tratamento (Engel, 1993).

Dentre os agentes etiológicos, a esclerose hipocampal é encontrada em 50-70% dos pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal (Engel, 1996). Do ponto de vista anatomopatológico a esclerose hipocampal caracteriza-se por perda neuronal e gliose reativa, especialmente das células das regiões CA1 e da região hilar, com relativa preservação de região CA2, subiculum e giro denteado (McNamara, 1994). Associado à perda neuronal, observa-se também a dispersão das células granulares. Esta é caracterizada pela perda da justaposição habitual das células granulares na camada granular do giro denteado, produzindo aumento da sua espessura e dos espaços intercelulares (El Bahh et al., 1999; Houser, 1990). Adicionalmente, observa-se uma importante reorganização axonal, caracterizada por brotamentos de sinapses colaterais das células granulares (as fibras musgosas) na região da camada molecular interna do giro denteado (Babb et al., 1991; Tauck and Nadler, 1985).

Apesar da relação entre esclerose hipocampal e epilepsia do lobo temporal estar bem estabelecida, o mecanismo exato pelo qual a esclerose hipocampal participa da gênese das crises epilépticas ainda é tema de grande debate. Já em 1954 havia a proposta de que a esclerose hipocampal poderia estar associada a uma história prévia de injúria precipitante inicial ocorrida em fases precoces do desenvolvimento cerebral (Meyer et al., 1954). Dentre as injúrias, destacam-se as crises epilépticas prolongadas (*status epilepticus*) e as convulsões febris (Mathern et al., 2002). Atualmente, sabe-se que cerca de 80% dos pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal possuem história

de convulsões febris e/ou *status epilepticus* durante os primeiros anos de vida (Falconer, 1971; French et al., 1993; Mathern et al., 1995; VanLandingham et al., 1998).

O dano cerebral resultante da crise epiléptica é um processo dinâmico composto por múltiplos fatores que contribuem para a morte neuronal. Estes podem incluir fatores genéticos, disfunção mitocondrial induzida por excitotoxicidade, níveis alterados de citocinas e stress oxidativo (Curia et al., 2008; Scorza et al., 2009). Apesar da ocorrência comum e da gravidade, as bases celulares e moleculares da epilepsia ainda são largamente desconhecidas (Banerjee et al., 2009; Elger and Schmidt, 2008). Mesmo com uma diversidade de drogas antiepilépticas atualmente disponíveis, aproximadamente 30% dos pacientes com epilepsia apresentam crises epilépticas refratárias. Nos últimos anos, tem se explorado combinações de estratégias neuroprotetoras e antiepileptogênicas que são efetivas para prevenção e tratamento de epilepsias. Além disso, estudos atuais com modelos animais tem aumentado nossa compreensão sobre as bases patológicas da epilepsia, fornecendo um grande conhecimento sobre a farmacologia das drogas empregadas como anticonvulsivos (Bialer and White, 2010) e se tornando de grande importância nas pesquisas desta desordem.

1.3 Modelos Animais de Epilepsia do Lobo Temporal

Os mecanismos complexos epileptogênicos e a geração das crises em epilepsia do lobo temporal e outras formas de epilepsia ainda não foram totalmente elucidados. Essa compreensão não pode ser totalmente obtida

apenas através de estudos clínicos com seres humanos. Portanto, a utilização de modelos animais adequados se torna essencial.

O ácido caínico (AC) foi um dos primeiros compostos utilizados para mimetizar modelos de epilepsia do lobo temporal em roedores. Como um análogo do neurotransmissor excitatório glutamato, o AC provoca a despolarização neuronal, levando à crises epiléticas e de frequência variável. O AC tem a característica de causar lesões restritas ao hipocampo, ao contrário de pilocarpina, que também pode produzir lesões em áreas neocorticais. Exatamente por isso a pilocarpina se torna bastante útil, pois as áreas extrahipocampais também estão significativamente comprometidas em pacientes com epilepsia do lobo temporal (Kandratavicius et al., 2014).

O modelo de pilocarpina tem sido amplamente utilizado em roedores para o estudo dos mecanismos neurais e das cascatas moleculares envolvidas na patogênese da epilepsia do lobo temporal (Alsharafi and Xiao, 2015; Cavalheiro, 1995; Leite et al., 1990; Turski et al., 1983a; Turski et al., 1983b; van der Hel et al., 2014).

Acredita-se que as crises epiléticas em paciente com epilepsia do lobo temporal podem ter sua origem, entre outras estruturas, no hipocampo. A relação com essa região não está totalmente esclarecida, mas uma causa possível seriam as massivas inervações colinérgicas que se projetam para o hipocampo. Isso porque a ativação repetitiva das fibras colinérgicas resulta na excitação contínua de neurônios do hipocampo (Friedman et al., 2007; Yaari and Jensen, 1989).

Quando administrada em altas doses (>300mg/Kg), a pilocarpina, que é um agonista do sistema colinérgico, promove episódios ictais prolongados que ao eletroencefalograma (EEG) mostram-se com aumento de, complexidade e amplitude, resultando em *status epilepticus*, SE). Estudos prévios mostraram que a pilocarpina induz um aumento nos níveis de glutamato no hipocampo, seguido pelo aparecimento da crise epiléptica que pode ser desencadeada e mantida pela ativação dos receptores M1 (colinérgico) e NMDA (glutamatérgico) (Nagao et al., 1996; Smolders et al., 1997).

Turski, Cavalheiro et al.(1983a) mostrou, pela primeira vez, a indução de crises epilépticas e ocorrência de alterações neuropatológicas induzidas por pilocarpina em ratos. Neste trabalho, foi sugerida a relação causal entre a estimulação excessiva de receptores colinérgicos e dano cerebral, além de caracterizar as respostas comportamentais da crise epiléptica. A atividade eletrográfica foi realizada comprovando-se através deste registro a atividade epileptiforme no cérebro.

Observou-se também que ratos sujeitos ao dano estrutural do cérebro induzido por *status epilepticus* desencadeado pela administração sistêmica de PILO podem apresentar o desenvolvimento de crises epilepticas espontâneas depois de um período de latência entre 14-15 dias, mimetizando a epilepsia em pacientes (Cavalheiro et al., 1991).

1.4 Peixe-Zebra

O peixe-zebra ou zebrafish (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo (3-4 cm) da família *Cyprinidae*, sendo uma espécie bastante conhecida pelo seu

uso como peixe ornamental. O pioneiro a estudar esta espécie foi George Streisinger que, no final da década de 60, aplicou as técnicas de análise mutacional para estudar o desenvolvimento embrionário deste peixe (Grunwald and Eisen, 2002). Atualmente, o peixe-zebra é um modelo experimental consolidado em diversas áreas da ciência, tais como: genética e genômica, biologia do desenvolvimento, teratologia, comportamento, toxicologia e neurociências (Vascotto et al., 1997). Este peixe se tornou um modelo experimental bastante atrativo para muitas áreas da ciência devido a características favoráveis que possui, as quais pode-se citar: pequeno custo e espaço requerido para manutenção, rápido desenvolvimento e ciclo biológico, grande prole, embriões translúcidos e suscetíveis à manipulação e microinjeção (Lele and Krone, 1996). O interesse pela espécie pode ser observado pelo número crescente de laboratórios que tem utilizado este animal como modelo experimental em suas pesquisas (Sprague et al., 2001).

Nos últimos anos, houve um progresso considerável na genética e genômica do peixe-zebra. Em 2001, o Instituto Sanger iniciou o sequenciamento do genoma total do peixe-zebra (Stern and Zon, 2003; Vogel, 2000), atualmente, já havendo concluído este sequenciamento (Howe et al., 2013). Além disso, grandes segmentos dos cromossomos do peixe-zebra estão em sintonia com os cromossomos humanos e de camundongo, e muitos genes apresentam um alto grau de similaridade, quando comparados em sua sequência (Barbazuk et al., 2000). O peixe-zebra se tornou o principal modelo experimental para o estudo do desenvolvimento de vertebrados (Anderson and Ingham, 2003). Recentemente, estudos avaliando características comportamentais do peixe-zebra foram desenvolvidos (Gerlai et al., 2000; Guo,

2004). A maioria dos trabalhos avaliou o efeito de pesticidas, drogas e xenobióticos na atividade comportamental desta espécie (Levin and Chen, 2004; Swain et al., 2004) . Alguns estudos também observaram a importância do comportamento inato e adquirido em modelos de agressão, sociabilidade e sua preferência por ambientes claros ou escuros (Serra et al., 1999).

Devido às vantagens de se usar o peixe-zebra como modelo experimental, o efeito agudo e crônico de diversas substâncias tóxicas pode ser avaliado facilmente (Gerlai et al., 2000). Devido ao pequeno espaço requerido por estes animais, uma quantidade menor de toxinas é empregada nos testes toxicológicos. Além disso, o efeito e a acumulação de diversas substâncias químicas vêm sendo testados no peixe-zebra desde o final dos anos 70 (Lele and Krone, 1996). Atualmente, muitos estudos são realizados nesta espécie para estudar as bases moleculares em neurobiologia, identificando genes envolvidos na formação de circuitos neuronais, no comportamento e nos mecanismos envolvidos na neuropatogênese (Guo, 2004; Vascotto et al., 1997). Muitos sistemas de neurotransmissão já foram identificados no peixe-zebra tais como: glutamatérgico (Edwards and Michel, 2002), colinérgico (Behra et al., 2002), dopaminérgico (Boehmler et al., 2004), serotoninérgico (Rink and Guo, 2004), histaminérgico (Kaslin and Panula, 2001), gabaérgico (Kim et al., 2004) e purinérgico (Kucenas et al., 2003; Rico et al., 2003; Senger et al., 2004).

Neste sentido, atualmente novas abordagens estão sendo aplicadas para o avanço nesta área de pesquisa. Com isso, o uso de novos modelos se torna de grande valia para uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos nesta patologia e, logo, o peixe-zebra surge como uma alternativa

complementar para o estudo de crises epiléticas e da epilepsia. Este pequeno teleósteo vem sendo cada vez mais utilizado como organismo modelo para o entendimento dos mecanismos da epilepsia. Diversos estudos apontam que crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) na larva (Baraban et al., 2005) e no adulto (Mussulini et al., 2013; Pineda et al., 2011; Wong et al., 2010) de peixe-zebra causaram alterações comportamentais e eletrográficas como as vistas em crises epiléticas. O peixe-zebra também apresentou respostas na utilização de drogas antiepilépticas, desde que alterações comportamentais foram suprimidas em larva com o pré-tratamento de fármacos antiepilépticos (Baraban et al., 2005; Berghmans et al., 2007).

Além disso, já foi visto que diversos fármacos pró-convulsivos, entre eles o PTZ e o AC, causaram diminuição da proliferação neuronal no cérebro imaturo (em desenvolvimento) do peixe-zebra (animais testados em 5 e 15 dias pós-fertilização) de idade (Kim et al., 2010). Também, foi visto em peixe-zebra adulto que a administração de AC desencadeia crises epiléticas similares as encontradas em roedores e que este efeito é dose-dependente, onde diversas doses de AC desencadearam uma sequência de mudanças comportamentais e as maiores doses culminaram em crises clônicas (Alfaro et al., 2011).

Até o momento, apenas um trabalho testou o efeito da pilocarpina em pesquisas com peixe-zebra (Vermoesen et al., 2011), com a utilização no modelo em larva, para a verificação de parâmetros comportamentais, avaliando o aumento da atividade locomotora, sendo que cada larva se encontrava alocada em um poço em uma placa de 96 poços. Portanto, esta dissertação se propôs a estudar os efeitos em peixe-zebra adulto, já que o adulto por apresentar maior tamanho e fenótipo comportamental mais complexo nos

permite futuros estudos com um grau de complexidade muito maior para ser aplicado em pesquisas translacionais.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi realizar uma caracterização da crise epiléptica induzida por diferentes doses de pilocarpina em peixe-zebra adulto.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a intensidade da crise epiléptica induzida por diferentes doses de pilocarpina.
- Caracterizar o perfil de escores das crises epilépticas apresentadas pelos animais induzidas por diferentes concentrações de pilocarpina.
- Determinar possíveis mudanças comportamentais ocasionadas pela indução da crise epiléptica em peixe-zebra adulto.
- Estabelecer a mortalidade induzida por diferentes concentrações de pilocarpina em peixe-zebra.
- Verificar o efeito do pré-tratamento com escopolamina sobre as manifestações das crises epilépticas induzidas por pilocarpina em peixe-zebra adulto.

PARTE II

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Peixes-zebra adultos foram adquiridos de um distribuidor local (Delphis, RS, Brasil) e aclimatados durante, pelo menos, duas semanas no biotério do Departamento de Bioquímica/UFRGS, em aquários de 30 litros, com uma densidade de dois animais/L. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia com *Artemia salina*, e mantidos nos aquários de aclimação com aeração e filtragem constante, temperatura de 28 ± 1 °C, ciclo claro/escuro de 14/10 h e pH =7,5. Foram realizadas trocas parciais de água (50% do volume total) semanalmente.

Para a realização deste projeto utilizamos animais com o peso entre 0,35g e 0,60g, de ambos os sexos.

3.2 Indução de crise epiléptica

Para a avaliação do perfil das crises epiléticas, os animais foram tratados com diferentes doses de pilocarpina (150, 200, 300, 350, 400 mg/Kg), (Sigma, St Louis, MO, USA). A PILO foi diluída em tampão salina fosfato (PBS) na concentração de 0,3M. Os animais foram anestesiados por imersão em triclaína (160 µg / mL), (Sigma, St Louis, MO, USA), e após, injetados (via intraperitoneal) com as respectivas doses de pilocarpina. Em seguida, os animais foram colocados individualmente em aquários de 1,5 litros (a água utilizada se encontrava nos mesmos parâmetros que nos aquários de manutenção dos peixes no biotério) e filmados durante 30min. para posterior análise do perfil das crises epiléticas. Um outro grupo de animais foi pré-tratado

com escopolamina, na dose de 1mg/Kg (Yuce et al., 2014), (Sigma, St Louis, MO, USA), 30min antes da injeção de pilocarpina (400mg/Kg). Os escores das crises epiléticas (Tabela 1) foram avaliados segundo (Alfaro et al., 2011).

Tabela 1. Escores das crises epiléticas (Modificado de Alfaro et al., 2011).

Escore	Descrição
Escore I	Imobilidade e aumento da frequência de abertura opercular.
Escore II	Comportamento natatório em forma de redemoinho.
Escore III	Movimentos rápidos da direita para esquerda.
Escore IV	Clonia e movimentos tônicos e anormal.
Escore V	Clonias rápidas de corpo inteiro.
Escore VI	Crises tônicas.
Escore VII	Morte.

3.3 Avaliação do perfil da atividade exploratória e locomotora

Para avaliarmos possíveis mudanças no perfil exploratório e locomotor induzidas pela crise epilética, os animais foram submetidos ao teste do *open-tank* para a verificação de mudanças no perfil locomotor quanto à exposição em um novo paradigma (Rosemberg et al., 2011) 3 dias após a administração de PILO. Os animais foram colocados individualmente no *open-tank*, e filmados durante 6min. A análise comportamental foi realizada pelo software (ANY-maze®, Stoelting CO, USA). Os parâmetros analisados foram: distância percorrida, tempo móvel, tempo no topo e tempo de permanência do animal no fundo do aparato.

3.4 Análise Estatística

Para a análise do perfil da crise epiléptica na Fig.1 plotamos os escores de crises epilépticas de cada grupo injetado com PILO, ao longo de 1800s, como mediana e intervalo interquartil. Nesta mesma figura, realizamos a análise da intensidade da crise em três intervalos de tempo (0-600, 600-1200 e 1200-1800s) onde coletamos as áreas sob as curvas formadas no gráfico do perfil dos escores, para cada indivíduo testado e em cada dose de injeção, e plotamos em gráficos separados como média + erro padrão. Nos gráficos de Frequência Acumulada na Fig.2, foram analisadas as porcentagens de animais, separados por dose injetada, que atingiram um determinado escore de crise epiléptica, ao longo do tempo. Os dados de sobrevivência dos grupos testados Tabela 2 foram apresentados como porcentagem de indivíduos que sobreviveram até 24 h após a aplicação dos fármacos.

Com relação aos testes estatísticos, os dados de intensidade da de crise epiléptica (0-600, 600-1200 e 1200-1800s), a latência dos animais para atingir o escore V e a análise dos dados do perfil locomotor coletados no *open-tank* foram analisados pela ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey e expressos como média \pm erro padrão da média (SEM), $p \leq 0,05$ considerado estatisticamente significativo. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software (GraphPad Software, San Diego California, USA).

RESULTADOS

Avaliação do perfil de crise epiléptica

Verifica-se na Fig.1 que após a injeção de pilocarpina os animais que atingem os mais altos escores da crise epiléptica são os dos grupos Pilo 350 e Pilo 400 mg/kg, enquanto os outros grupos com concentrações menores de pilocarpina apresentaram escores intermediários. O grupo PILO 150 apresenta seu maior escore II em 600s, enquanto o grupo PILO 200 atinge o pico do escore II em 300s e o escore III em 1200s. A maior média de escore atingida pelos indivíduos do grupo PILO 300 é o escore IV, enquanto os indivíduos tanto do grupo PILO 350 quanto do PILO 400 atingiram o escore VI, sendo que o grupo PILO 400 alcança este escore em 900s enquanto o grupo PILO 350 só ao final do teste. A Fig.1 nos mostra que os escores V e VI, que são os mais altos e característicos da crise tônico-clônica, foram atingidos principalmente pelas doses de 350 e 400 mg/Kg.

Também podemos ver que a intensidade da crise epiléptica apresenta valores crescentes junto com o aumento da dose aplicada $F(5,62) = 87.19$, $p < 0,0001$, sendo maiores os valores do grupo PILO 400 ($2108 \pm 80,91$) e prevenindo este efeito com o grupo Escop./PILO 400 ($56,25 \pm 39,46$) no intervalo entre 0-600s. No intervalo entre 600-1200s, podemos constatar um perfil semelhante da crise epiléptica ($F(5,61) = 24.44$, $p < 0,0001$; PILO150 = $425 \pm 86,27$, PILO400 = $3100 \pm 199,1$ e Escop./Pilo400 = $300 \pm 238,9$). Já no último intervalo analisado 1200-1800s, $F(5,62) = 18.68$, $p < 0,0001$, verificamos igualmente que a intensidade da crise epiléptica se intensifica com o aumento da dose testada (PILO150 = $475 \pm 93,84$, PILO400 = $3250 \pm 151,5$ com a

prevenção do efeito causado pela injeção da escopolamina Escop./PILO400= 450±408,8.

Com o aumento das doses de PILO uma maior porcentagem dos animais apresenta escores de crises altos em tempos menores. No gráfico de frequência acumulada PILO150 (Fig. 2) pode-se observar que uma porcentagem menor que 10% dos animais chegou ao escore III (maior escore apresentado neste grupo) a partir de 900s de teste e 90% dos animais apresentou escore II e todos o escore I. No grupo PILO200 podemos ver que aproximadamente 16% dos indivíduos chegaram ao escore IV, e até os 1800s todos apresentaram escore III ou menor. No gráfico PILO300 podemos ver que este grupo apresentou aproximadamente 50% dos indivíduos atingindo escore IV até 900s (100% atingiu escore III ou menor até 1200s). Também em 1200s, 50% dos animais atingiram o escore V (primeira dose a apresentar indivíduos neste escore) e valores semelhantes para o escore VI. Já o grupo PILO350, 50% dos animais apresentaram escore V no tempo de 600s chegando a aproximadamente 57% no tempo 1200s. 57% dos indivíduos atingiram o escore VI em 1800s, já tendo 30% dos animais apresentado este escore em 600s, permanecendo este valor até 1200s quando outros indivíduos apresentam este escore. O grupo PILO400, sendo a maior dose injetada de pilocarpina 400mg/Kg, apresenta mais de 70% dos animais no tempo 450s com escore V permanecendo este valor até o final do teste. Este grupo mostrou um número maior de animais apresentando uma crise epiléptica mais severa e já em 400s temos 40% dos animais com escore VI chegando a 75% em 900s, a partir deste tempo não houve outros animais que mostraram este escore. Pode-se ver que o grupo PILO400 (maior dose) apresentou 70% dos indivíduos

no escore V no tempo de 450s e o grupo PILO300 possuiu somente 50% dos animais testados atingindo o escore V no tempo de 1200s (similar ao grupo PILO350), em um tempo muito maior quando comparado ao PILO400, enquanto nenhum indivíduo em doses menores e no grupo Escop./PILO400 atingiu este escore. Além disso, vemos que doses maiores levaram a um maior número de indivíduos com escore VI (crise tônica) em tempo menor enquanto doses menores não apresentaram este perfil, sendo este efeito novamente revertido pela aplicação da escopolamina prévia a injeção de pilocarpina.

Na Figura 3 pode-se verificar o efeito das doses de pilocarpina sobre a chegada dos animais no escore V em tempos diferentes $F(5,48)=209.5$, $p<0,0001$. O grupo PILO400 (400 ± 25) apresentou uma latência menor para o escore V, um dos maiores escores comportamentais da crise epiléptica, em tempo menor que o do grupo PILO300 ($700\pm 63,25$) e estatisticamente igual ao grupo PILO350 ($600\pm 103,5$), enquanto os outros grupos não atingiram este escore e a escopolamina aparece atuando como um inibidor da crise epiléptica revertendo o efeito da PILO. A tabela 2 mostra os dados de sobrevivência dos animais após a injeção de PILO nas diferentes doses e no grupo injetado com escopolamina + pilocarpina. Nas doses de 150, 200, 300 e Escop./PILO 400 mg/Kg os animais apresentaram 100% de sobrevivência enquanto as doses de 350 e 400 mg/Kg apresentaram 83% e 66% de sobrevivência respectivamente.

Avaliação do perfil exploratório e locomotor

Quando os animais foram submetidos ao aparato *open-tank* (Fig, 4), para a avaliação de seu perfil locomotor (exploratório), estes não apresentaram

diferença estatística significativa quanto à distância percorrida $F(5,54)=1.077$, $p=0,38$ e tempo móvel no aparato $F(5,54)=0.89$, $p=0.48$, entre todos os grupos, durante o tempo de teste. O grupo Escopolamina/PILO400 ($61,19\pm 12,57$) apresentou um maior tempo de permanência no topo quando comparado ao grupo controle ($14,51\pm 4,88$; todos os outros grupos não apresentam diferença estatística quando comparados ao grupo controle) $F(5,54)=15.91$, $p<0,0001$. Por conseguinte, os animais apresentaram um menor tempo de permanência no fundo do aparato quando comparado aos grupos injetados com PILO (PILO400= $348\pm 5,04$; Escop./PILO400= $256,9\pm 21,10$), mas não apresentaram diferença quando comparado ao controle ($294,2\pm 27,38$) $F(5,54)=4.5$, $p=0,0017$.

PARTE III

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o peixe-zebra adulto apresenta um perfil de crises epiléticas desencadeado pela injeção i.p. de PILO também encontrado com a utilização de outras drogas já testadas como o PTZ e o AC. Baraban, Taylor et al.(2005) demonstrou que o PTZ desencadeia crises epiléticas na larva do peixe-zebra. Mais recentemente, diversos estudos tem utilizado o peixe-zebra adulto, realizando análises como parâmetros comportamentais, avaliação eletrofisiológica em animais imobilizados e expressão de *c-fos* no SNC (Afrikanova et al., 2013; Pineda et al., 2011). Vermoesen, Serruys et al. (2011) apresentou os efeitos pró-convulsivos da pilocarpina na larva do peixe-zebra, mas até o momento nenhum trabalho havia estudado a indução de crises epiléticas no adulto.

Algumas das diferenças de se trabalhar com o modelo adulto quando comparado ao larval são a quantidade de material biológico de um único indivíduo, sistema gabaérgico ainda não totalmente desenvolvido em juvenil, logo, a busca de terapias em juvenil pode não sobrepor as mesmas vias que no adulto. Além disso, o fenótipo comportamental mais complexo do adulto quando comparado ao da larva, se torna mais adequado para se realizar uma classificação do perfil das crises epiléticas e da intensidade das crises em adulto mais detalhada.

Alfaro, Ripoll-Gomez et al (2011) categorizou o perfil das crises epiléticas em peixe-zebra adulto, utilizando o modelo químico de AC para a indução de crise. Em nosso trabalho, encontramos o perfil das crises epiléticas induzido por PILO bastante semelhante ao encontrado no AC,

enquanto o escore VI descrito em nosso trabalho se assemelha mais ao escore V no modelo de pentilenotetrazol (PTZ) descrito por (Mussulini et al., 2013), em comparação na Tabela 3.

Tabela 3. Comparação entre escores de crises em diferentes modelos.

Autor	Alfaro <i>et al.</i> 2011	Mussulini <i>et al.</i> 2013	Pinto <i>et al.</i> (Dados não publicados)
Escore I	Imobilidade e hiperventilação do animal	Atividade natatória aumentada e alta frequência de movimentos operculares.	Imobilidade e hiperventilação do animal.
Escore II	Comportamento natatório em forma de redemoinho.	Nado explosivo, movimentos esquerda-direita e movimentos erráticos.	Comportamento natatório em forma de redemoinho.
Escore III	Movimentos rápidos da direita para esquerda.	Movimento circular.	Movimentos rápidos da direita para esquerda.
Escore IV	Contrações musculares anormais e espasmódicas.	Comportamento semelhante a crises clônicas.	Clonia e movimentos tônicos e anormal.
Escore V	Convulsões clônicas de corpo inteiro.	Queda para o fundo do tanque e comportamento de crises tônica.	Clonias rápidas de corpo inteiro.
Escore VI	Mergulho para o fundo do tanque e espasmos durante vários minutos.		Crises tônicas.

O perfil apresentado pelo peixe-zebra após as diferentes doses aplicadas mostrou um claro efeito de dose sobre o perfil de crise epiléptica, com os animais apresentando maiores escores de crises epilépticas nas

maiores doses de pilocarpina aplicadas e que a injeção de escopolamina prévia ao tratamento com PILO previniu um perfil comportamental de crises em peixe-zebra. Os escores encontrados se assemelham ao de outros trabalhos publicados na literatura reforçando o uso destes parâmetros comportamentais como descritores confiáveis para a análise das crises neste modelo. Como vimos na dose de 150 mg/Kg os animais apresentaram basicamente uma alternância entre escores I e II ao longo do tempo enquanto o grupo 200 mg/Kg também apresentou os escores III e IV. Com a aplicação de uma dose maior de 300 mg/Kg uma parcela de 40% dos animais entrou em escore V e VI, sendo que a aplicação de 350 mg/Kg levou mais de 50% dos animais a estes escores ao longo de 1800s. Já no grupo 400mg/kg, maior dose de pilocarpina injetada, os indivíduos atingiram o escore V em apenas 450s, sendo estes representados por 70% dos indivíduos testados neste grupo. Este resultado se assemelha ao encontrado em trabalhos com roedores (Turski et al., 1983a; Turski et al., 1984) onde a aplicação de diferentes doses leva a crises epiléticas de diferentes perfis e intensidades como o relatado em nosso trabalho com peixe-zebra.

Uma medida bastante utilizada em outros trabalhos para avaliação da crise epilética e da atividade antiepilética de fármacos em modelo com roedores é o tempo que os indivíduos levam para atingir o estágio onde apresentam o perfil comportamental semelhante a crises clônicas, que denominamos como latência para o escore V (Fig. 3). Os animais apresentaram uma latência reduzida para a entrada no escore V na dose de 400 mg/Kg quando comparado ao grupo 300 mg/Kg, sendo que nos grupos 150, 200 e Escop./Pilo 400 mg/Kg não observamos a ocorrência deste escore.

Este resultado nos indica que a injeção de escopolamina pode prevenir o aparecimento do fenótipo comportamental similar à crise epiléptica induzida pelas doses mais altas de pilocarpina, além de indicar o aumento da intensidade do da crise epiléptica na maior dose testada.

O nosso trabalho mostrou que o mecanismo de ação da escopolamina é conservado em peixe-zebra uma vez que a escopolamina foi capaz de prevenir o fenótipo comportamental de crises em peixe-zebra, mas ainda falta comprovarmos os efeitos elétricos sobre os neurônios, uma vez que não realizamos registro eletroencefalográfico. Através da perspectiva farmacológica tentamos verificar a ação da pilocarpina e da crise epiléptica sobre o sistema colinérgico, para isso a escopolamina, como um antagonista muscarínico, foi utilizada. Sabendo que a pilocarpina e a escopolamina poderiam estar atuando sobre o sistema periférico, estudos futuros com butiril escopolamina (antagonista muscarínico que não ultrapassa a barreira hematoencefálica) se faz necessário para a verificação dos efeitos específicos sobre o SNC.

Vimos também que a mortalidade do grupo 400 mg/Kg (Tabela 2) foi similar ao de roedores 400mg/Kg e fica por volta de 40% dos animais. Portanto não aumentamos a dose de pilocarpina, pois este grupo reproduziu com grande semelhança os parâmetros de roedores (porcentagem de animais que desenvolveram crises epilépticas, porcentagem de animais que não tiveram crises e a mortalidade) e é a dose mais utilizada para modelo de crise epiléptica/epilepsia em roedores, pois há a uma mortalidade mediana dos indivíduos.

No intuito de avaliar o perfil comportamental dos animais, foi necessário dar um prazo de recuperação aos mesmos. Sabe-se que a janela de recuperação fisiológica de pacientes humanos pode demorar até 48 h e o período pós-ictal dura de 6 a 48h. Então baseado neste dado escolhemos avaliar três dias após a injeção com pilocarpina. Quanto a avaliação comportamental, três dias após a indução da crise, mostramos que o peixe-zebra não apresentou mudanças quanto ao perfil exploratório no *open-tank* sobre diversos parâmetros medidos como tempo móvel, distância percorrida, tempo no topo e tempo no fundo do aparato. Apesar disso, houve uma tendência dos animais diminuírem o tempo no topo do aparato ao longo de doses maiores. O resultado mostra que a escopolamina apresenta um efeito no sistema nervoso central do peixe-zebra e que pode reverter uma pequena tendência dos grupos submetidos unicamente à injeção de pilocarpina de apresentar menor tempo no topo e maior tempo no fundo, apesar desta pequena diferença não ser estatisticamente significativa na comparação destes grupos com o grupo controle. Os resultados nos indicam que o grupo injetado com escopolamina apresentou algum déficit comportamental visto que os animais passaram mais tempo explorando o topo e menos tempo o fundo. Como descrito por (Stewart et al., 2011) o *open-tank* pode ser um paradigma comportamental para se medir um fenótipo comportamental de ansiedade em peixe-zebra, onde a maior permanência do animal no topo representaria efeitos ansiolíticos enquanto que a maior permanência do animal no fundo representaria um estado ansioso, já que a superfície da coluna de água seria um ambiente mais aversivo ao animal por ser um lugar onde este se encontra mais vulnerável à predação e o animal só gastaria mais tempo neste ambiente

se estivesse menos ansioso quando comparado a outros grupos. Logo, como visto por (Zarrindast et al., 2011), a injeção de escopolamina em roedores apresentou efeito ansiolítico que poderia se assemelhar aos encontrados em nosso trabalho e cujo efeito poderia estar influenciando sobre as mudanças exploratórias no *open-tank* encontradas por nós no grupo onde a escopolamina foi aplicada.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitiram uma caracterização temporal das manifestações comportamentais do peixe-zebra adulto ao serem injetados com diferentes concentrações com pilocarpina. Neste trabalho podemos concluir que a dose mais adequada para a utilização em futuras investigações é a de 400 mg/kg, onde aproximadamente 75% dos animais exibiram um perfil de crise tônico-clônica bastante intenso, apresentando uma taxa de mortalidade similar a verificada em roedores.

Também podemos concluir que os animais apresentaram seu comportamento alterado pela escopolamina, assim como em roedores, mostrando a conservação da ação dos receptores em peixe-zebra.

ANEXO

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 1: Efeito de diferentes concentrações de pilocarpina sobre o perfil de crises epiléticas. Os escores das crises foram avaliados segundo a (Tabela1.) após a indução da crise com doses de 150, 200, 300, 350, 400 mg/Kg de pilocarpina e sobre o bloqueio da crise ocasionado pela injeção de escopolamina anteriormente a injeção de 400 mg/Kg de pilocarpina, ao longo do tempo. Intensidade da crise avaliada utilizando-se as áreas sob a curva dos gráficos de cada animal individualmente e dividida em três intervalos de tempo (0-600s, 600-1200s e 1200-1800s). Perfil da crise: avaliados segundo média \pm erro padrão ao longo do tempo. Intensidade da crise: média \pm desvio padrão, letras diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$, ANOVA de uma via seguido do teste post hoc de Tukey).

Fig. 2: Frequência acumulada dos escores de crise epilética ao longo do tempo. Porcentagem dos animais de cada tratamento que apresenta um determinado escore da crise epilética (Tabela 1.) após a indução da crise, ao longo de 30min.

Fig. 3: Latência para o escore V. Barras representam média \pm erro padrão do intervalo de tempo até os indivíduos atingirem o escore V (Tabela1.) nos

diferentes tratamentos. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Tukey, considerando $p \leq 0,05$ significativa; letras diferentes significando diferença entre os grupos; # Não Observado).

Fig. 4: Perfil locomotor 3 dias após a injeção de pilocarpina (200, 300, 350, 400), escopolamina/pilo e grupo controle, dos animais expostos ao aparato *open-tank*. Os animais foram filmados durante 6min. após serem colocados no aparato para análise posterior. Os gráficos apresentam a distância total percorrida, o tempo móvel, o tempo no topo e o tempo no fundo gasto por cada grupo testado no tempo total de teste. Os dados são expressos como média \pm SEM, * indica diferença estatística comparada ao grupo controle e letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$, ANOVA de uma via seguido do teste post hoc de Tukey).

FIGURAS

Figura1.

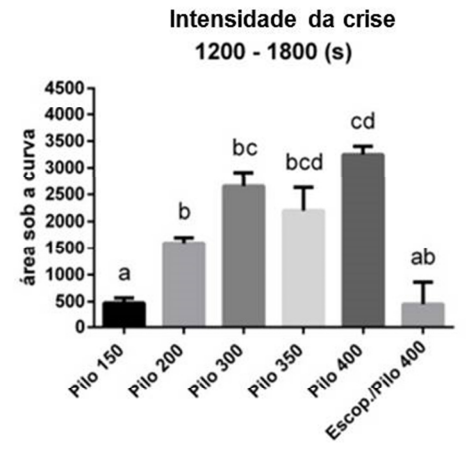
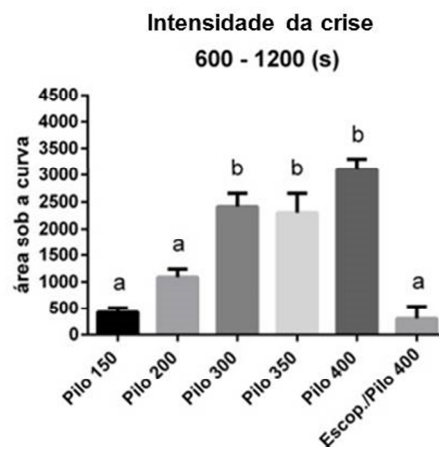
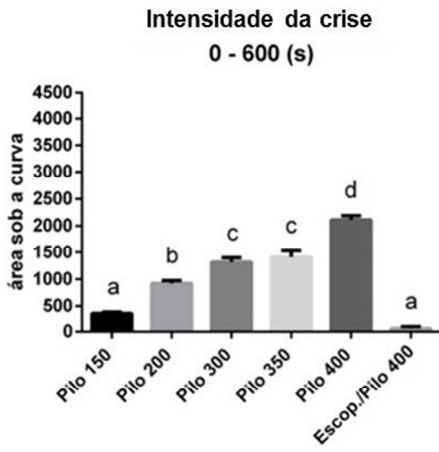
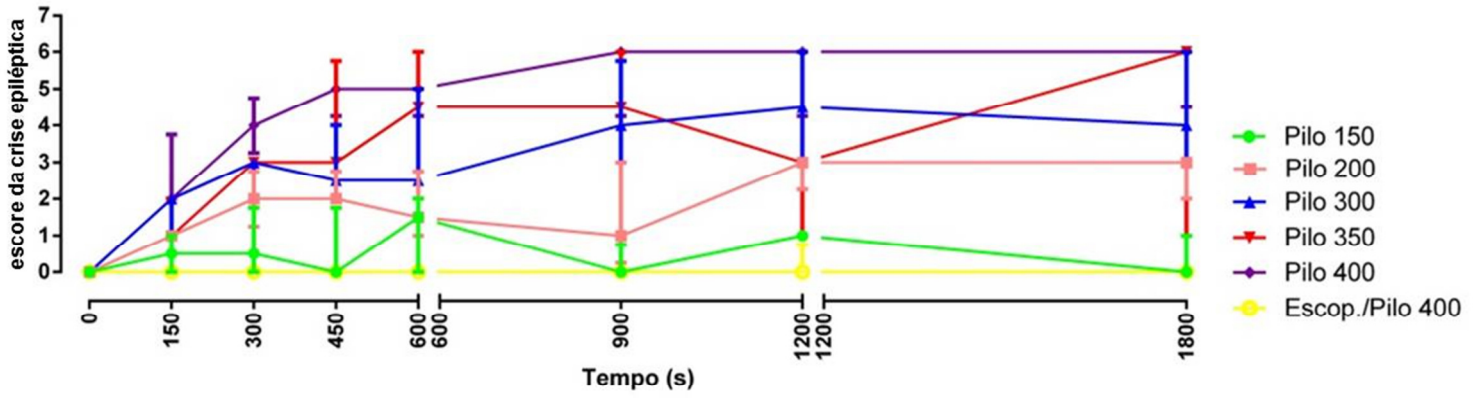


Figura2.

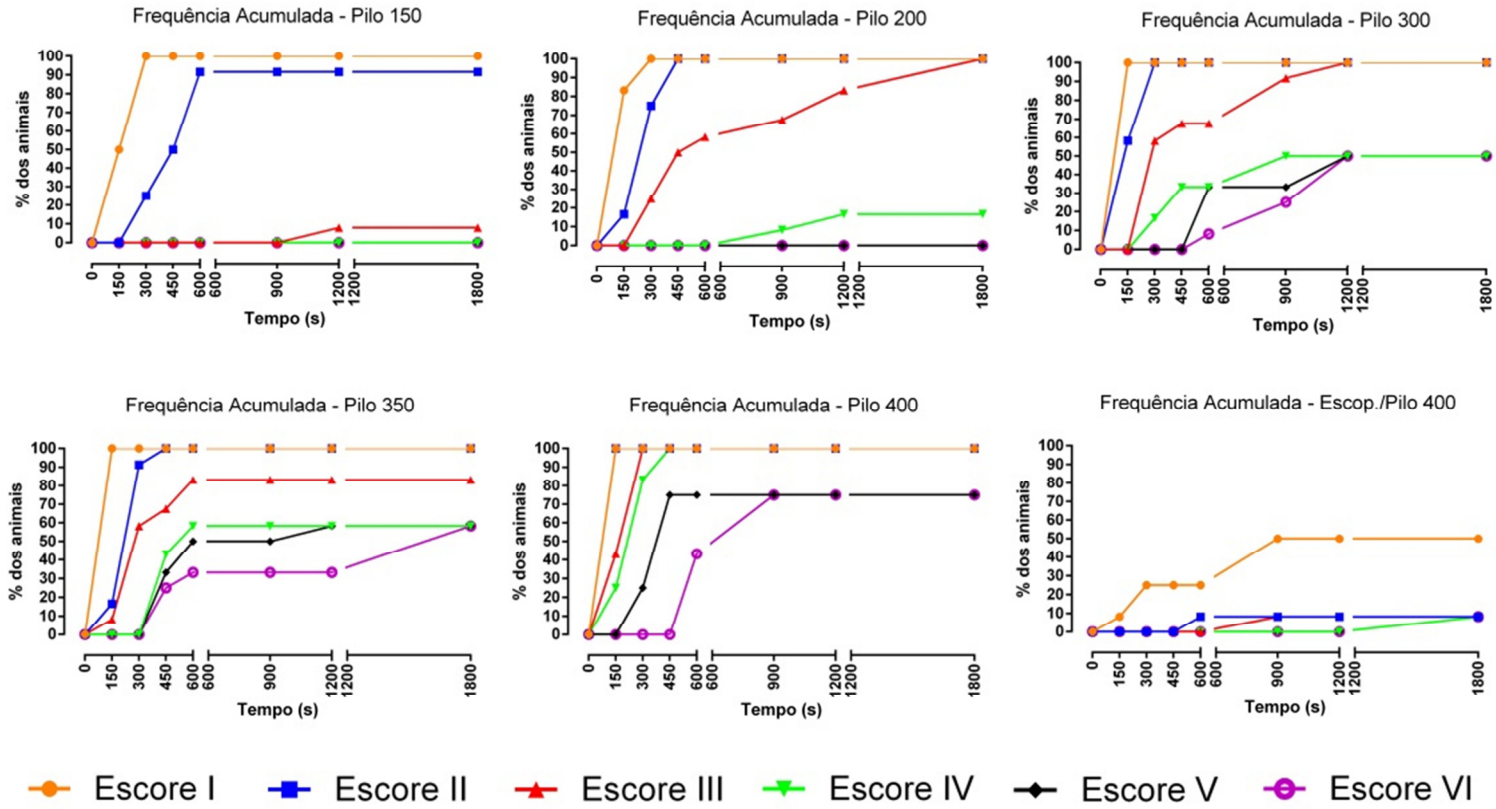


Figura 3.

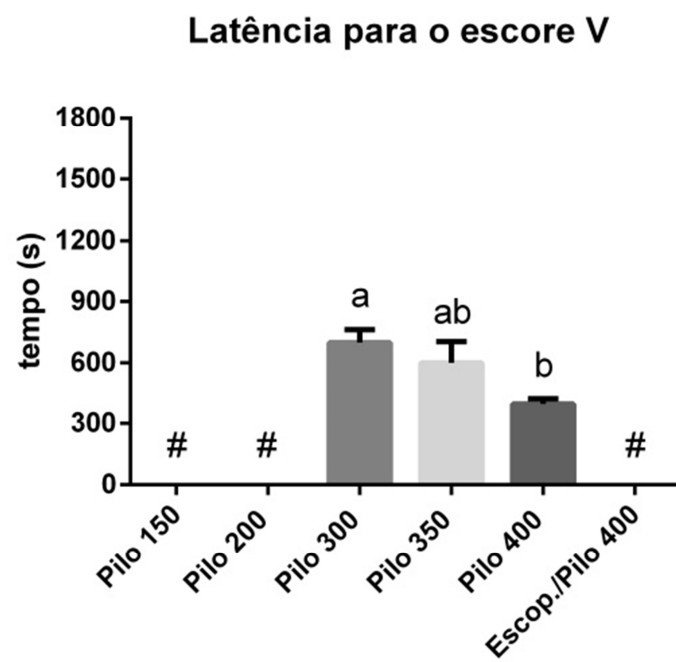


Figura 4.

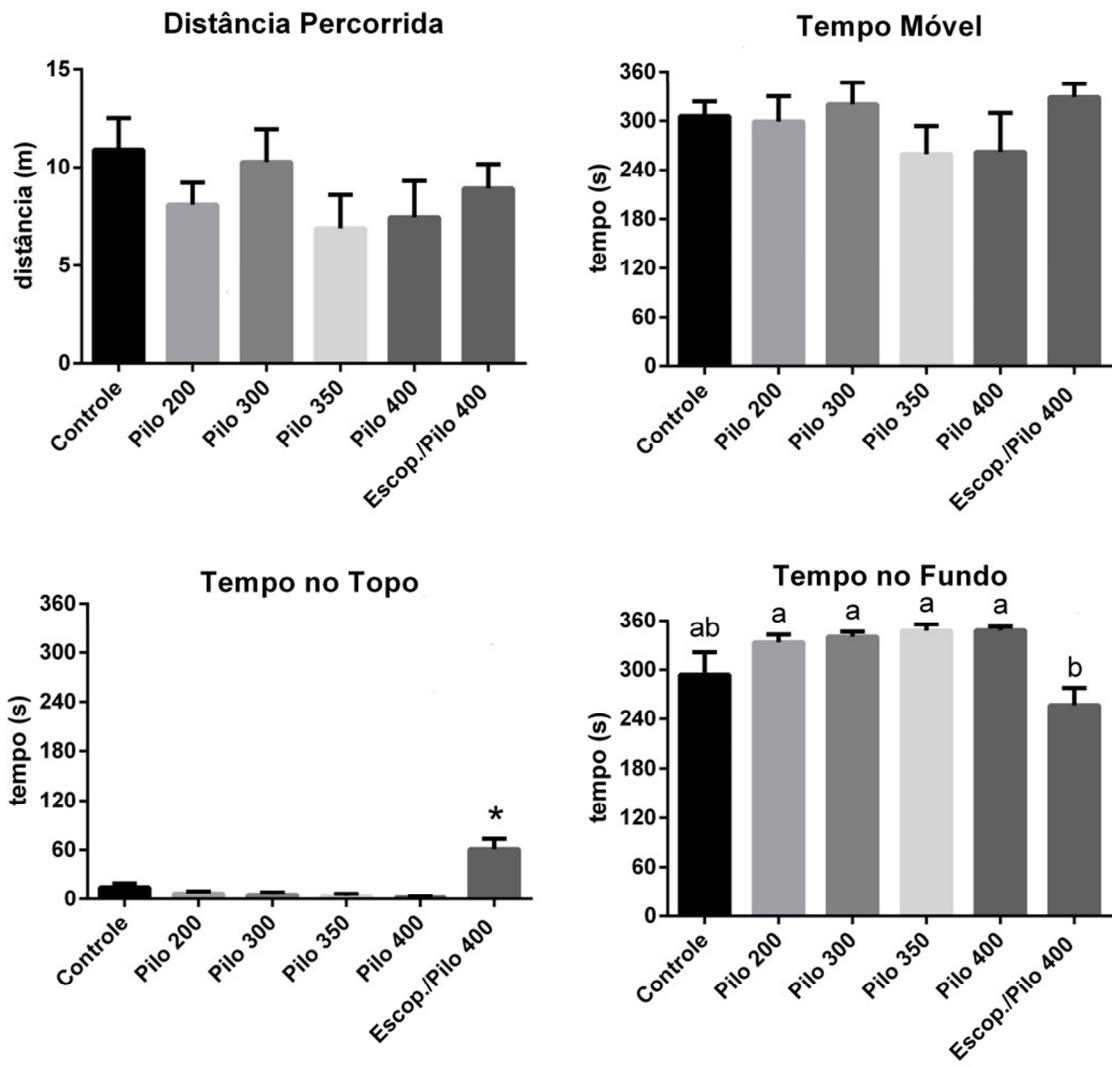


Tabela 2. Sobrevivência dos animais até 24h após tratamento.

	Sobrevivência (%)
Controle	100
Pilo 150	100
Pilo 200	100
Pilo 300	100
Pilo 350	83
Pio 400	66
Escop./Pilo 400	100

REFERÊNCIAS

- Afrikanova, T., Serruys, A.S., Buenafe, O.E., Clinckers, R., Smolders, I., de Witte, P.A., Crawford, A.D., Esguerra, C.V., 2013. Validation of the zebrafish pentylenetetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. *PLoS One*. 8, e54166.
- Alfaro, J.M., Ripoll-Gomez, J., Burgos, J.S., 2011. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. *Eur J Neurosci*. 33, 1252-5.
- Alsharafi, W.A., Xiao, B., 2015. Dynamic expression of microRNAs (183, 135a, 125b, 128, 30c and 27a) in the rat pilocarpine model and temporal lobe epilepsy patients. *CNS Neurol Disord Drug Targets*.
- Anderson, K.V., Ingham, P.W., 2003. The transformation of the model organism: a decade of developmental genetics. *Nature Genetics*. 33 Suppl, 285-93.
- Babb, T.L., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Crandall, P.H., Levesque, M.F., 1991. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience*. 42, 351-63.
- Banerjee, P.N., Filippi, D., Allen Hauser, W., 2009. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. *Epilepsy Res*. 85, 31-45.
- Baraban, S.C., Taylor, M.R., Castro, P.A., Baier, H., 2005. Pentylenetetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience*. 131, 759-68.

- Barbazuk, W.B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Bedell, J.A., McPherson, J.D., Johnson, S.L., 2000. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 10, 1351-8.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J.L., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strahle, U., 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat Neurosci.* 5, 111-8.
- Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., Goldsmith, P., 2007. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75, 18-28.
- Bialer, M., White, H.S., 2010. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 9, 68-82.
- Boehmler, W., Obrecht-Pflumio, S., Canfield, V., Thisse, C., Thisse, B., Levenson, R., 2004. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev Dyn.* 230, 481-93.
- Caulder, E.H., Riegler, M.A., Godwin, D.W., 2014. Activation of group 2 metabotropic glutamate receptors reduces behavioral and electrographic correlates of pilocarpine induced status epilepticus. *Epilepsy Res.* 108, 171-81.
- Cavalheiro, E.A., Leite, J.P., Bortolotto, Z.A., Turski, W.A., Ikonomidou, C., Turski, L., 1991. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia.* 32, 778-82.

- Cavalheiro, E.A., 1995. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci.* 16, 33-7.
- Centre, N.C.G., 2012. The epilepsies: the diagnosis and management of the epilepsies in adults and children in primary and secondary care. National Institute for Health and Clinical Excellence.
- Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R.S., Avoli, M., 2008. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods.* 172, 143-57.
- Edwards, J.G., Michel, W.C., 2002. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 454, 294-309.
- El Bahh, B., Lespinet, V., Lurton, D., Coussemaq, M., Le Gal La Salle, G., Rougier, A., 1999. Correlations between granule cell dispersion, mossy fiber sprouting, and hippocampal cell loss in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 40, 1393-401.
- Elger, C.E., Schmidt, D., 2008. Modern management of epilepsy: a practical approach. *Epilepsy Behav.* 12, 501-39.
- Engel, J., Jr., 1993. Clinical neurophysiology, neuroimaging, and the surgical treatment of epilepsy. *Curr Opin Neurol Neurosurg.* 6, 240-9.
- Engel, J., Jr., 1996. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 26, 141-50.

- Engel, J., Jr., 2001. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*. 42, 796-803.
- Falconer, M.A., 1971. Genetic and related aetiological factors in temporal lobe epilepsy. A review. *Epilepsia*. 12, 13-31.
- French, J.A., Williamson, P.D., Thadani, V.M., Darcey, T.M., Mattson, R.H., Spencer, S.S., Spencer, D.D., 1993. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol*. 34, 774-80.
- Friedman, A., Behrens, C.J., Heinemann, U., 2007. Cholinergic dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 48 Suppl 5, 126-30.
- Gastaut, H., Gastaut, J.L., Goncalves e Silva, G.E., Fernandez Sanchez, G.R., 1975. Relative frequency of different types of epilepsy: a study employing the classification of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 16, 457-61.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A., 2000. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav*. 67, 773-82.
- Grunwald, D.J., Eisen, J.S., 2002. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet*. 3, 717-24.
- Guo, S., 2004. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav*. 3, 63-74.

- Hermann, B.P., Seidenberg, M., Bell, B., Woodard, A., Rutecki, P., Sheth, R., 2000. Comorbid psychiatric symptoms in temporal lobe epilepsy: association with chronicity of epilepsy and impact on quality of life. *Epilepsy Behav.* 1, 184-90.
- Hesdorffer, D.C., Hauser, W.A., Annegers, J.F., Cascino, G., 2000. Major depression is a risk factor for seizures in older adults. *Ann Neurol.* 47, 246-9.
- Hitiris, N., Mohanraj, R., Norrie, J., Sills, G.J., Brodie, M.J., 2007. Predictors of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsy Res.* 75, 192-6.
- Houser, C.R., 1990. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 535, 195-204.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assuncao, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliot, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd,

C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthravadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Urun, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberlander, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nusslein-Volhard, C., Hubbard, T.J., Roest Crolius, H., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 496, 498-503.

Kandratavicius, L., Balista, P.A., Lopes-Aguiar, C., Ruggiero, R.N., Umeoka, E.H., Garcia-Cairasco, N., Bueno-Junior, L.S., Leite, J.P., 2014. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 10, 1693-705.

- Kaslin, J., Panula, P., 2001. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol.* 440, 342-77.
- Kim, Y.H., Lee, Y., Lee, K., Lee, T., Kim, Y.J., Lee, C.J., 2010. Reduced neuronal proliferation by proconvulsant drugs in the developing zebrafish brain. *Neurotoxicol Teratol.* 32, 551-7.
- Kim, Y.J., Nam, R.H., Yoo, Y.M., Lee, C.J., 2004. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett.* 355, 29-32.
- Kucenas, S., Li, Z., Cox, J.A., Egan, T.M., Voigt, M.M., 2003. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience.* 121, 935-45.
- Leite, J.P., Nakamura, E.M., Lemos, T., Masur, J., Cavalheiro, E.A., 1990. Learning impairment in chronic epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. *Braz J Med Biol Res.* 23, 681-3.
- Lele, Z., Krone, P.H., 1996. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnol Adv.* 14, 57-72.
- Levin, E.D., Chen, E., 2004. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 26, 731-5.
- Lowe, F.C., Dreikorn, K., Borkowski, A., Braeckman, J., Denis, L., Ferrari, P., Gerber, G., Levin, R., Perrin, P., Senge, T., 1998. Review of recent placebo-controlled trials utilizing phytotherapeutic agents for treatment of BPH. *Prostate.* 37, 187-93.

- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Babb, T.L., 1995. Influence of the type of initial precipitating injury and at what age it occurs on course and outcome in patients with temporal lobe seizures. *J Neurosurg.* 82, 220-7.
- Mathern, G.W., Adelson, P.D., Cahan, L.D., Leite, J.P., 2002. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog Brain Res.* 135, 237-51.
- McNamara, J.O., 1994. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci.* 14, 3413-25.
- Meyer, A., Falconer, M.A., Beck, E., 1954. Pathological findings in temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 17, 276-85.
- Motamedi, G., Meador, K., 2003. Epilepsy and cognition. *Epilepsy Behav.* 4 Suppl 2, S25-38.
- Mussulini, B.H., Leite, C.E., Zenki, K.C., Moro, L., Baggio, S., Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Dias, R.D., Souza, T.M., Calcagnotto, M.E., Campos, M.M., Battastini, A.M., de Oliveira, D.L., 2013. Seizures induced by pentylenetetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. *PLoS One.* 8, e54515.
- Nabbout, R., Dulac, O., 2008. Epileptic syndromes in infancy and childhood. *Curr Opin Neurol.* 21, 161-6.
- Nagao, T., Alonso, A., Avoli, M., 1996. Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. *Neuroscience.* 72, 399-408.

- Organization, W.H., 2012. Epilepsy. Fact Sheets. Vol., ed.^eds.
- Pineda, R., Beattie, C.E., Hall, C.W., 2011. Recording the adult zebrafish cerebral field potential during pentylentetrazole seizures. *J Neurosci Methods*. 200, 20-8.
- Puttachary, S., Sharma, S., Stark, S., Thippeswamy, T., 2015. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Biomed Res Int*. 2015, 745613.
- Rico, E.P., Senger, M.R., Fauth Mda, G., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2003. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci*. 73, 2071-82.
- Rink, E., Guo, S., 2004. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neuroscience*. 127, 147-54.
- Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Mussulini, B.H., Piato, A.L., Calcagnotto, M.E., Bonan, C.D., Dias, R.D., Blaser, R.E., Souza, D.O., de Oliveira, D.L., 2011. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS One*. 6, e19397.
- Sander, J.W., 2003. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol*. 16, 165-70.
- Scorza, F.A., Arida, R.M., Naffah-Mazzacoratti Mda, G., Scerni, D.A., Calderazzo, L., Cavalheiro, E.A., 2009. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc*. 81, 345-65.

- Senger, M.R., Rico, E.P., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2004. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 139, 203-7.
- Serra, E.L., Medalha, C.C., Mattioli, R., 1999. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Braz J Med Biol Res.* 32, 1551-3.
- Smolders, I., Khan, G.M., Manil, J., Ebinger, G., Michotte, Y., 1997. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol.* 121, 1171-9.
- Sprague, J., Doerry, E., Douglas, S., Westerfield, M., 2001. The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. *Nucleic Acids Res.* 29, 87-90.
- Stern, H.M., Zon, L.I., 2003. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Cancer.* 3, 533-9.
- Stewart, A., Wu, N., Cachat, J., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., Utterback, E., Gilder, T., Kyzar, E., Newman, A., Carlos, D., Chang, K., Hook, M., Rhymes, C., Caffery, M., Greenberg, M., Zadina, J., Kalueff, A.V., 2011. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 35, 1421-31.
- Swain, H.A., Sigstad, C., Scalzo, F.M., 2004. Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol.* 26, 725-9.

- Tauck, D.L., Nadler, J.V., 1985. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci.* 5, 1016-22.
- Thurman, D.J., Beghi, E., Begley, C.E., Berg, A.T., Buchhalter, J.R., Ding, D., Hesdorffer, D.C., Hauser, W.A., Kazis, L., Kobau, R., Kroner, B., Labiner, D., Liow, K., Logroscino, G., Medina, M.T., Newton, C.R., Parko, K., Paschal, A., Preux, P.-M., Sander, J.W., Selassie, A., Theodore, W., Tomson, T., Wiebe, S., for the, I.C.o.E., 2011. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. *Epilepsia.* 52, 2-26.
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L., 1983a. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 9, 315-35.
- Turski, W.A., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L., 1983b. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia.* 39, 1408-11.
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Bortolotto, Z.A., Mello, L.M., Schwarz, M., Turski, L., 1984. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain Res.* 321, 237-53.
- van der Hel, W.S., Hessel, E.V., Bos, I.W., Mulder, S.D., Verlinde, S.A., van Eijsden, P., de Graan, P.N., 2014. Persistent reduction of hippocampal glutamine synthetase expression after status epilepticus in immature rats. *Eur J Neurosci.* 40, 3711-9.

- VanLandingham, K.E., Heinz, E.R., Cavazos, J.E., Lewis, D.V., 1998. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions. *Ann Neurol.* 43, 413-26.
- Vascotto, S.G., Beckham, Y., Kelly, G.M., 1997. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol.* 75, 479-85.
- Vermoesen, K., Serruys, A.S., Loyens, E., Afrikanova, T., Massie, A., Schallier, A., Michotte, Y., Crawford, A.D., Esguerra, C.V., de Witte, P.A., Smolders, I., Clinckers, R., 2011. Assessment of the convulsant liability of antidepressants using zebrafish and mouse seizure models. *Epilepsy Behav.* 22, 450-60.
- Victoroff, J.I., Benson, F., Grafton, S.T., Engel, J., Jr., Mazziotta, J.C., 1994. Depression in complex partial seizures. Electroencephalography and cerebral metabolic correlates. *Arch Neurol.* 51, 155-63.
- Vogel, G., 2000. Genomics. Sanger will sequence zebrafish genome. *Science.* 290, 1671.
- Wong, K., Stewart, A., Gilder, T., Wu, N., Frank, K., Gaikwad, S., Suci, C., Dileo, J., Utterback, E., Chang, K., Grossman, L., Cachat, J., Kalueff, A.V., 2010. Modeling seizure-related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish. *Brain Res.* 1348, 209-15.
- Yaari, Y., Jensen, M.S., 1989. Cholinergic modulation of hippocampal epileptic activity in vitro. *EXS.* 57, 150-8.
- Yuce, M., Ilkaya, F., Karabekiroglu, K., Say, G.N., Mujdeci, M., Bayril, F., Agri, A.E., Guzel, H., Aydin, F., 2014. Improving Effect of Atomoxetine and

Reboxetine on Memory in Passive Avoidance Task. *Klinik Psikofarmakoloji Bulteni-Bulletin of Clinical Psychopharmacology*. 24, 211-219.

Zarrindast, M.R., Nasehi, M., Piri, M., Heidari, N., 2011. Effects of cholinergic system of dorsal hippocampus of rats on MK-801 induced anxiolytic-like behavior. *Neurosci Lett*. 505, 65-70.