

# Impacto do Azul de Metileno no Padrão Comportamental e Molecular de Crises Epilépticas em Zebrafish

Lucas Biglia Gonçalves Ramos<sup>1</sup>, Jhonathan Angel Araújo Fernandez<sup>1</sup>, Viviane  
Cristina Fais<sup>1</sup>, Cláudia Vianna Maurer-Morelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Zebrafish, Departamento de Medicina Translacional, FCM, UNICAMP.  
Agência Fomentadora: CNPq e FAPESP-CEPID BRAINN

# Introdução

Epilepsias são doenças neurológicas crônicas comuns, caracterizadas por crises epiléticas e que afetam em torno de 70 milhões de pessoas no mundo

Modelos animais para o estudo das epilepsias e crises epiléticas são de grande contribuição para estudo da doença e desenvolvimento de medicamentos:



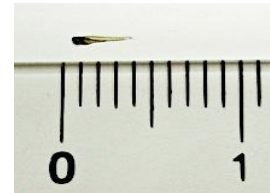
Fonte: Brazilian journal of cardiovascular surgery

# Introdução

O Zebrafish como modelo animal nos estudos de epilepsia e crise epiléptica:



Embrião  
(0h – 72h)



Larva  
(72h – 30 dias)



Adulto  
( > 3 meses)

Figuras Arquivo LabZeb

Desde 2005 possui modelo de crise epiléptica validado:

[Comparative Study](#) > [Neuroscience](#). 2005;131(3):759-68. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.11.031.

## Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression

S C Baraban<sup>1</sup>, M R Taylor, P A Castro, H Baier

Affiliations – collapse

### Affiliation

<sup>1</sup> Epilepsy Research Laboratory, Department of Neurological Surgery, University of California, San Francisco, Box 0520, 503 Parnassus Avenue, San Francisco, CA 94143, USA.

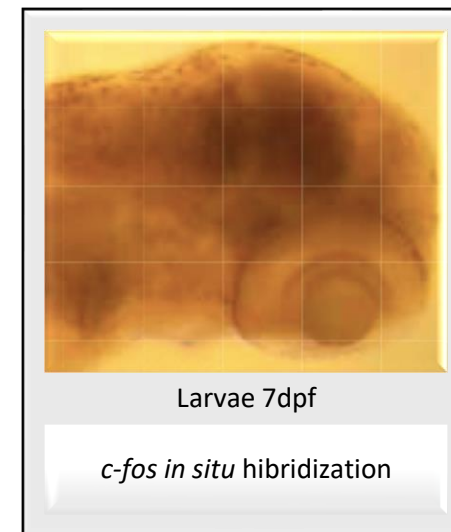
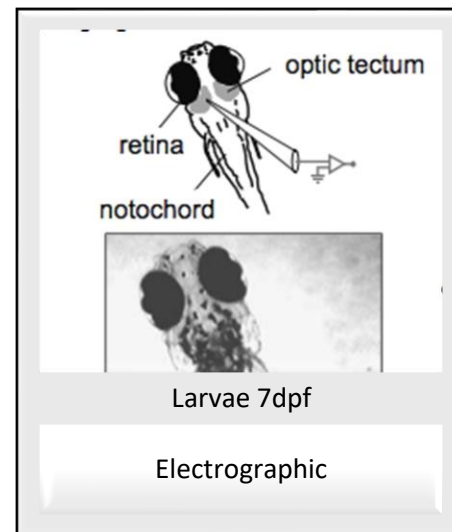
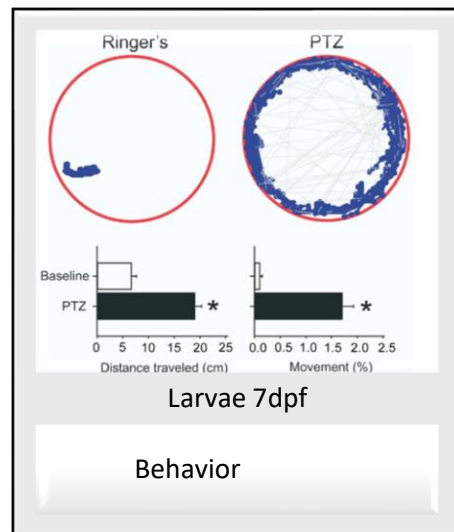
## PENTYLENETETRAZOLE INDUCED CHANGES IN ZEBRAFISH BEHAVIOR, NEURAL ACTIVITY AND C-FOS EXPRESSION

S. C. BARABAN,<sup>a\*</sup> M. R. TAYLOR,<sup>a</sup> P. A. CASTRO,<sup>a</sup> AND H. BAIER<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Epilepsy Research Laboratory, Department of Neurological Surgery, University of California, San Francisco, Box 0520, 503 Parnassus Avenue, San Francisco, CA 94143, USA

<sup>b</sup>Department of Physiology, University of California, San Francisco, Box 2722, 1550 4th Street, San Francisco, CA 94158, USA

15mM of Pentilenotetrazol (PTZ)



# Introdução



Fonte: depositphotos

O Azul de Metileno (AM) é um composto com propriedades antioxidantes usado a mais de 100 anos na medicina com diversas utilidades

É utilizado como antifúngico em laboratórios ao redor do mundo na manutenção e crescimento de embriões e larvas de Zebrafish

Até o início desta IC não havia estudos prévios que indicassem se o AM modificava ou não a resposta experimental em modelos de crise epiléptica em zebrafish

# Objetivos



1- Investigar se o AM altera parâmetros comportamentais de larvas 7dpf de zebrafish expostas ao Pentilenotetrazol (PTZ) em protocolos de indução de crise epiléptica: agudo e status epilepticus-like (SE-like).

2-Pesquisar se o AM modifica o perfil transcricional dos genes transcritos: c-fos (atividade neuronal), casp3 (pró-apoptótico), bcl2a (anti-apoptótico), e sod2 (estresse oxidativo)

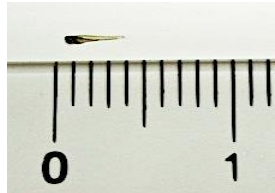
3-Analisar se o protocolo de manutenção de embriões e larvas (E3+AM) tem a capacidade de interferir na indução de crises epilépticas em larvas de 7dpf,

# Métodos



Embriões obtidos por acasalamento natural de animais adultos *wild-type* do Laboratório Zebrafish-FCM

N=25 em cada grupo



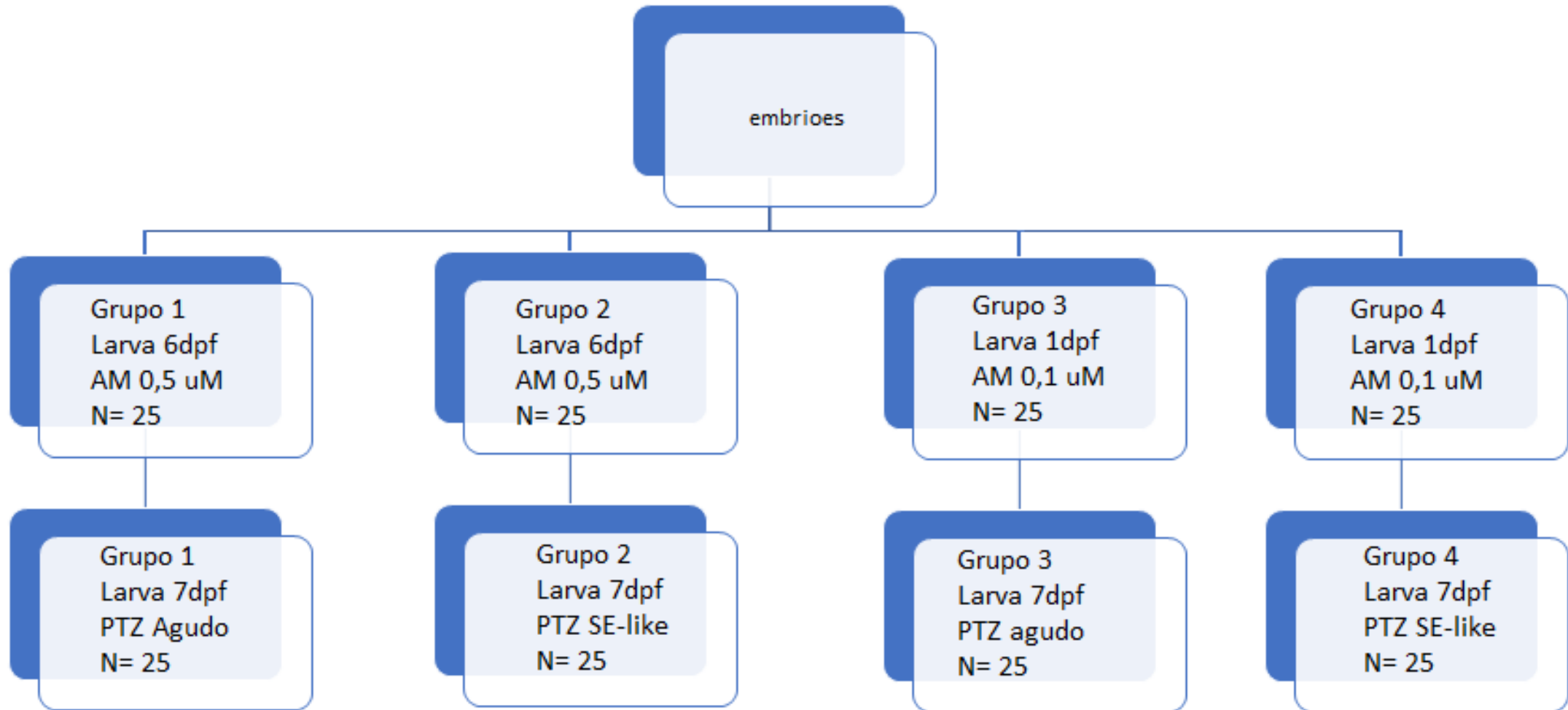
Grupos 1 e 2: Avaliaram influência do AM 0,5  $\mu\text{M}$  por 24h no 6dpf nos protocolos de convulsão agudo e SE-like por PTZ 15mM

Grupos 3 e 4: Avaliaram influência do AM 0,1  $\mu\text{M}$  desde 1dpf nos protocolos de convulsão agudo e SE-like por PTZ 15mM

\*Cada grupo teve seu respectivo controle positivo

\*\*Há um grupo controle negativo apenas mantido com AM e que não foi exposto ao PTZ

# Fluxograma



Cada grupo possui seu respectivo controle positivo (peixes que não foram expostos ao AM)  
O grupo 1 possui o controle negativo (exposto ao AM porém não ao PTZ)



# Métodos

-*Análise comportamental*: Software Ethovision em equipamento DanioVision para a quantificação do nado, medindo a velocidade e distância percorridas nos protocolos Agudo e SE-like

- *Análise molecular*: *c-fos* (atividade neuronal), *casp3* (pró-apoptótico), *bcl2a* (anti-apoptótico), e *sod2* (estresse oxidativo).

--Técnica da RT-qPCR para avaliação dos transcritos dos genes. Equipamento ABI 7500 com técnica de SYBr Green e método de análise  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para quantificação dos transcritos.

# Métodos

-A análise estatística foi realizada usando-se o programa GraphPadPrism versão 8.0.2

-Para a análise de três grupos foi empregada a ANOVA com correção de Tukey.

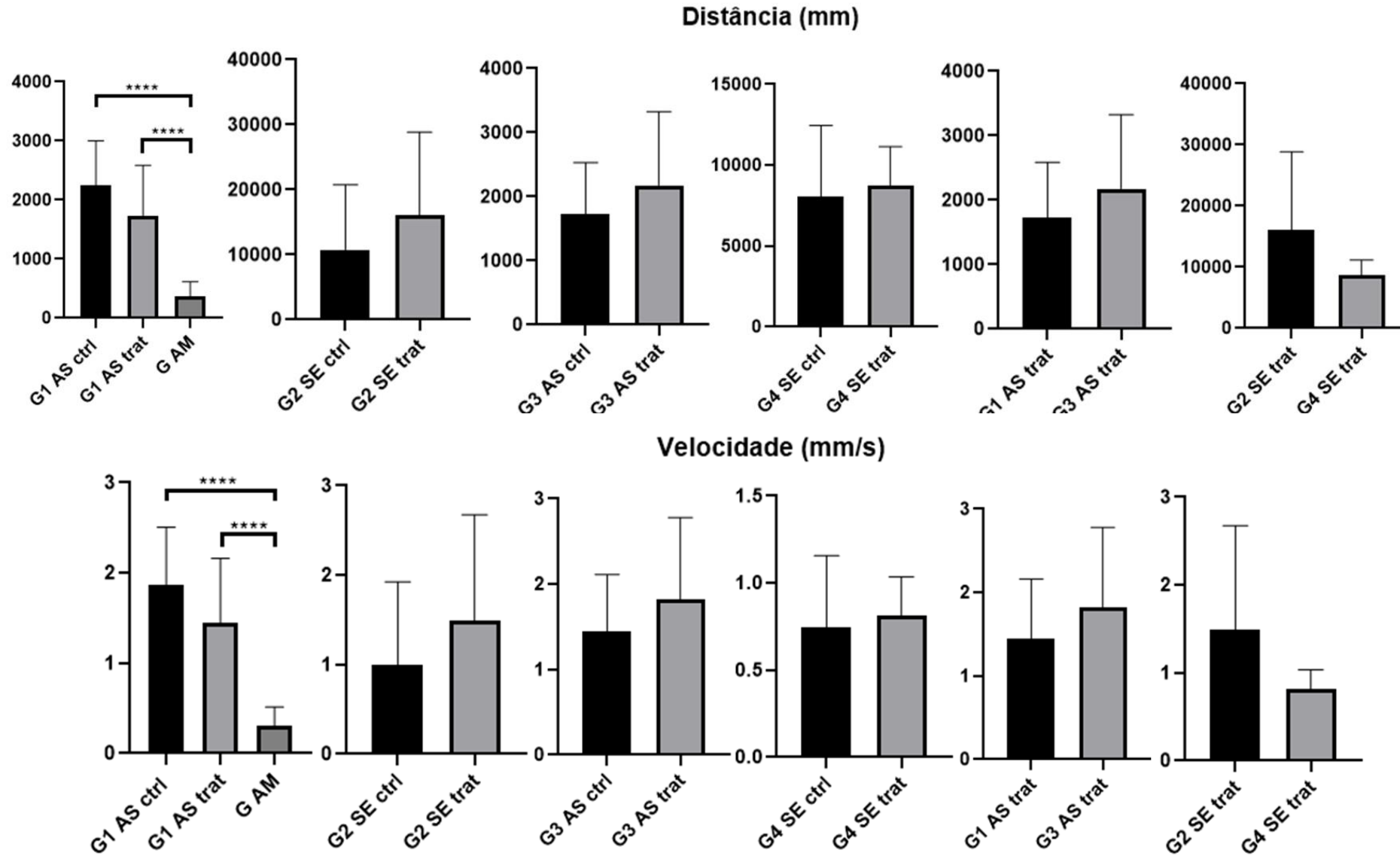
-Para análise de dois grupos foi empregado Teste t.

-Em todos os casos o nível de significância considerado foi  $p \leq 0.05$ .

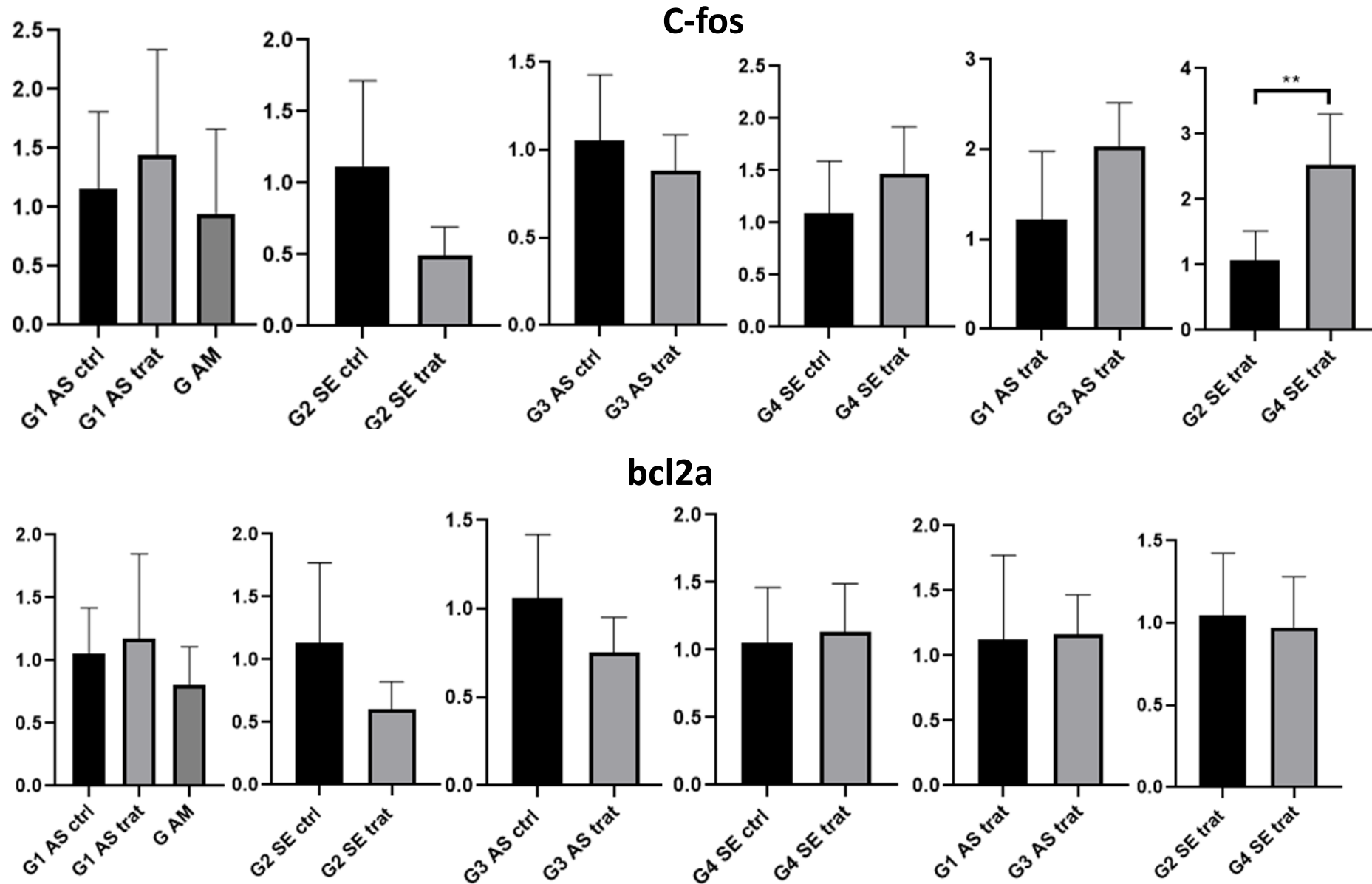
# Aspectos éticos

- Este projeto se encontra de acordo com a Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008 e com o decreto nº 6.899 de 15 de Julho de 2009.
- Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Unicamp – CEUA/UNICAMP, registrado com o nº 5287-1/2019, em reunião de 13/06/2019.

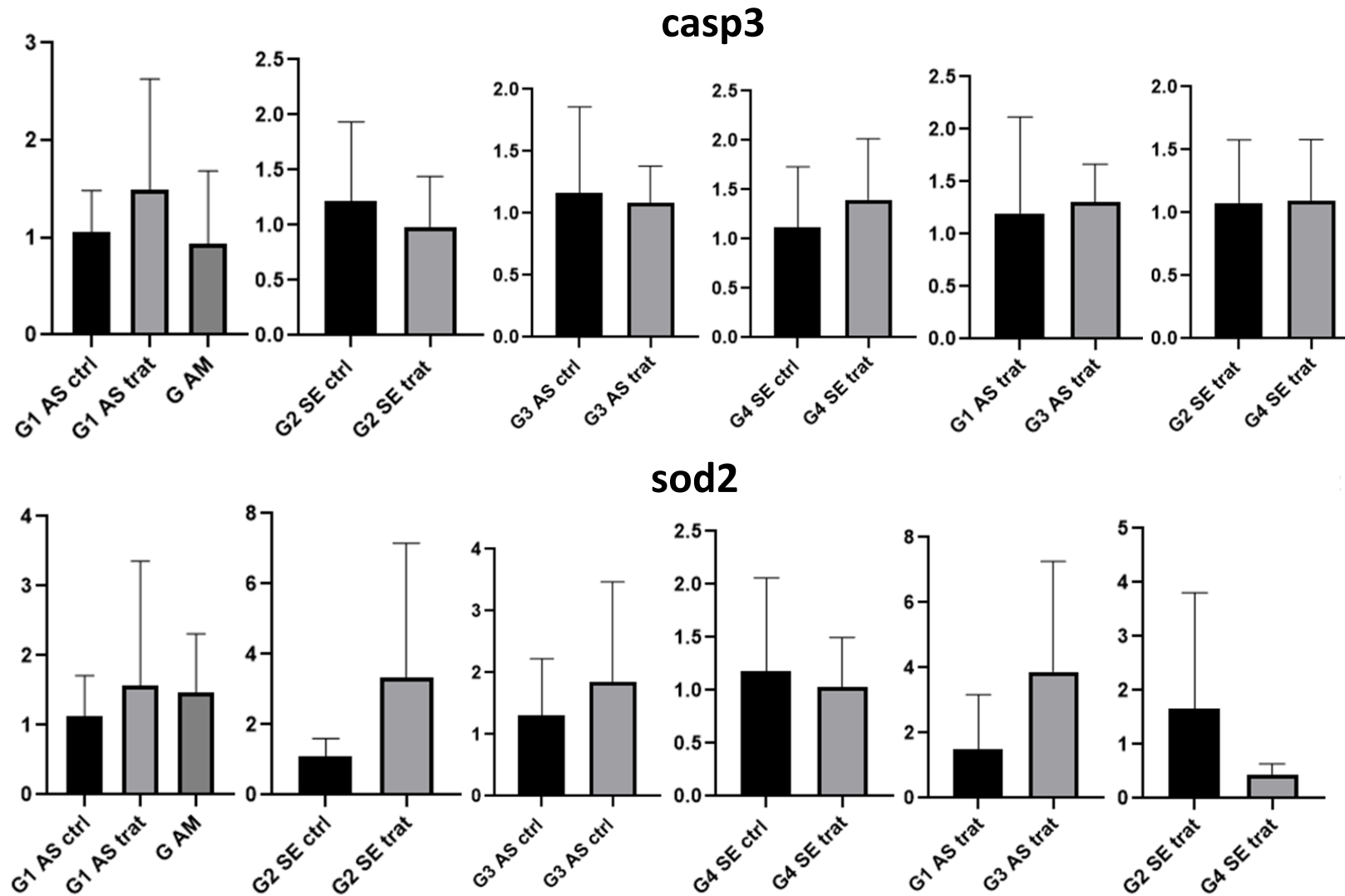
# Resultados: Análise comportamental



# Resultados: Análise molecular



# Resultados: Análise molecular





# Conclusão

- AM na concentração  $0,5\mu\text{M}$  por 24h reduziu o impacto do PTZ sobre o cérebro do zebrafish, diminuindo significativamente a atividade neuronal durante as crises epilépticas do tipo *status epilepticus* em comparação com o tratamento de manutenção de colônia (0,  $1\mu\text{M}$  +meio).
- Porém, esse impacto não resultou em diminuição da atividade de nado do animal.
- AM nos protocolos de manutenção de colônia de zebrafish, não modificou o comportamento relacionado com crises epilépticas, bem como, não teve influência significativa sobre o perfil dos transcritos dos genes investigados.

# Referências Básicas:



- 1- Pitkänen, A., Sshwartzkroin, P. A & Moshe, S. L. Models of seizures and epilepsy. Boston: Elsevier Academic Press; 2006.
- 2- Shin JT, Fishman MC. FROM ZEBRAFISH TO HUMAN: Modular Medical Models Annual Reviews; 2002. p. 35.
- 3- Baraban SC, Taylor MR, Castro PA, Baier H. Pentylenetetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. Neuroscience. 2005;131(3):759- 68.
- 4- Poteet E, Winters A, Yan LJ, Shufelt K, Green KN, Simpkins JW, et al. Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives. PLoSOne. 2012;7(10):e48279.