



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

Lucas Biglia Gonçalves Ramos¹, Jhonathan Angel Araújo Fernandez¹, Viviane Cristina Fais¹,
Cláudia Vianna Maurer Morelli¹

¹Laboratório de Zebrafish, Departamento de Genética Médica e Medicina Genômica, FCM, UNICAMP.

Introdução: Modelos animais são importantes para estudos experimentais que mimetizam doenças ou condições humanas, como as epilepsias e crises epiléticas. O *Danio rerio*, também chamado de zebrafish ou peixe paulistinha, tem sido empregado como modelo para estudos genéticos e moleculares envolvendo epilepsias e triagem de drogas e novos compostos para supressão de crises epiléticas. O Azul de Metileno (AM) é um composto aromatic solúvel em água usado há mais de 120 anos em diversas aplicações e ocorrências médicas e é conhecido por sua ação antioxidante e de neuroproteção e, por essa razão, seu potencial terapêutico tem sido investigado em algumas doenças neurodegenerativas. Todavia, o AM é frequentemente usado como um antifúngico em aquários ao redor de todo o mundo e normalmente é incorporado ao meio de crescimento e manutenção de embriões de zebrafish. Contudo, até o momento não há estudos que mostrem se o AM é capaz de modificar as respostas de protocolos experimentais no zebrafish, principalmente aqueles que envolvem resposta ao estresse oxidativo. Portanto, este estudo visa investigar se o AM pode modificar o padrão comportamental e molecular do zebrafish induzido à crise epilética por Pentilenotetrazol (PTZ).

Objetivos: 1. Investigar se o AM interfere em parâmetros comportamentais de larvas 7dpf (dias pós-fertilização) de zebrafish submetidas ao PTZ em dois protocolos de indução de crise epileptica: Agudo (20 minutos) e Status Epilepticus-like (3 horas). 2. Investigar se o AM altera a expressão de transcritos dos genes: *c-fos* (atividade neuronal), *casp3* (pró-apoptótico), *bcl2a* (anti-apoptótico), e *sod2* (estresse oxidativo). 3. Analisar e identificar se o protocolo de manutenção de embriões e larvas (E3+AM) tem a capacidade de modificar a indução de crises epiléticas por PTZ em larvas 7dpf, uma vez que essa é a idade mais usada nos estudos das crises epiléticas nesses peixes.

Materiais e Métodos: Para avaliar a influência do AM nos protocolos de convulsões: Larvas selvagens de zebrafish aos 6dpf foram divididas aleatoriamente em (n = 25 cada grupo):

- G1 AS trat: larvas expostas a 0,5 μ M de AM por 24h antes da crise epileptic induzida por PTZ 15mM por 20 minutos (protocolo de crise epilética aguda).
- G1 AS ctrl: larvas manuseadas da mesma forma que G1 AS trat, mas, não são expostas ao AM.
- G AM: animais, serão manuseados da mesma forma que G1 AS trat e G2 SE trat, mas em AM-água e não serão expostos ao PTZ.
- G2 SE trat: larvas expostas a 0,5 μ M AM por 24h antes da convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) 15mM por 3h (protocolo de status epilepticus-like).

- G2 SE ctrl: larvas manuseadas da mesma forma que G2 SE trat, mas, não são expostas ao AM.

Para avaliar a influência do MB na manutenção dos embriões: Larvas selvagens de zebrafish no 1dpf foram divididas aleatoriamente em (n = 25 cada grupo):

- G3 AS trat: larvas expostas a 0,1µM de AM por 7dpf, no 7dpf são submetidas a convulsão induzida por PTZ 15mM por 20 minutos (protocolo de convulsão aguda).
- G3 AS ctrl: larvas manuseadas da mesma forma que G3 AS trat, mas, não são expostas ao AM.
- G4 SE trat: larvas expostas a 0,1µM de AM por 7dpf, no 7dpf são submetidas a convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) 15mM por 3 horas (protocolo status epilepticus-like).
- G4 SE ctrl: larvas manuseadas da mesma forma que G4 SE trat, mas, não são expostas ao AM.

Para todos os grupos descritos acima, os padrões de comportamento foram monitorados usando o Danio Vision System e avaliados pelo Software Ethovision. Os animais foram sacrificados e suas cabeças coletadas para extração total do RNA. O qPCR em tempo real (n = 5 cada grupo) foi executado em triplicata para investigar genes relacionados a diferentes vias moleculares: *sod2*, *casp3*, *bcl2a* e *c-fos*. Os níveis de transcritos do mRNA dos genes alvo foram normalizados pelo gene housekeeping *ef1a*. Entretanto, devido a quarentena imposta pela pandemia e com o fechamento dos laboratórios para atividades não essenciais, apenas os genes *ef1a* e *c-fos* foram analisados. Assim que possível, pretendemos quantificar os genes restantes. As reações de qPCR em Tempo Real foram realizadas em equipamento ABI 7500 (AppliedBiosystems), Foster City, CA, EUA). As reações ocorreram em triplicatas e os valores do Ct das reações foram importados para uma planilha de Excel para a análise relativa da expressão de genes. A expressão relativa do gene alvo foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A análise estatística foi realizada usando-se o programa GraphPadPrism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) considerando o nível de significância $p \leq 0.05$.

Resultados:

Análise comportamental

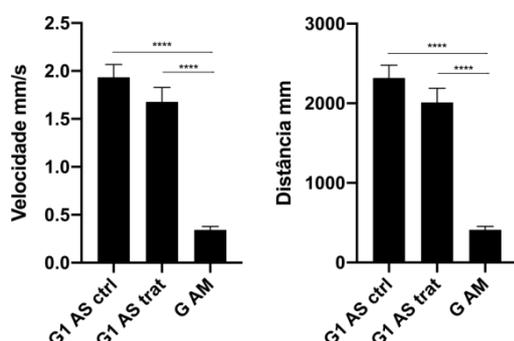


Figura 1: Efeito do tratamento do Azul de Metileno 0,5µM 24h antes da crise epiléptica induzida por PTZ 15mM. A figura mostra os gráficos de Velocidade (mm/s) e Distância (mm) dos grupos G1 AS ctrl, G1 AS trat e G AM. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão; n=6. A diferença estatística foi determinada por Anova de uma via. **** indicam $P < 0,0001$. AS= Grupo submetido a crise epiléptica aguda, 20 minutos. AM= azul de metileno. Ctrl=controle. Trat=tratamento.

Não foi observada diferença significativa quando comparadas as médias de velocidade e distância do G1 AS trat com G1 AS ctrl. Foi observado diferença significativa ($****p < 0,0001$) quando G1 AS trat é comparado com seu controle negativo G AM. Quando comparamos os dois

grupos submetidos ao PTZ, mostra que nesta concentração e tempo de exposição, o AM não foi suficiente para modificar o comportamento do animal.

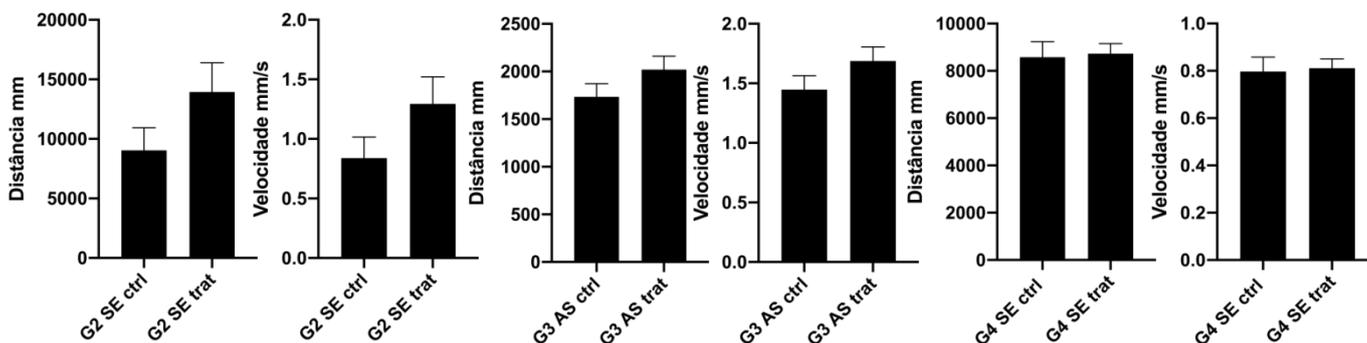


Figura 2: Efeito do tratamento do Azul de Metileno $0,5\mu\text{M}$ 24h antes da crise epiléptica induzida por PTZ 15mM para G2 SE. Efeito do tratamento do Azul de Metileno $0,1\mu\text{M}$ por 7 dias antes da crise epiléptica induzida por PTZ 15mM para G3 AS e G4 SE. As figuras mostram os gráficos de Distância (mm) e Velocidade (mm/s) dos grupos: G2 SE trat vs G2 SE ctrl. G3 AS trat vs G3 AS ctrl. G4 SE trat vs G4 SE ctrl. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão; $n=6$. A diferença estatística foi determinada por Teste t. AS= Grupo submetido a crise epiléptica aguda, 20 minutos. SE= Grupo submetido a crise epiléptica SE-like, 3 horas. Ctrl=controle. Trat=tratamento.

Não foi encontrado diferença significativa quando comparados G2 SE trat vs G2 SE ctrl, G3 AS trat vs G3 AS ctrl e G4 SE trat vs G4 SE ctrl.

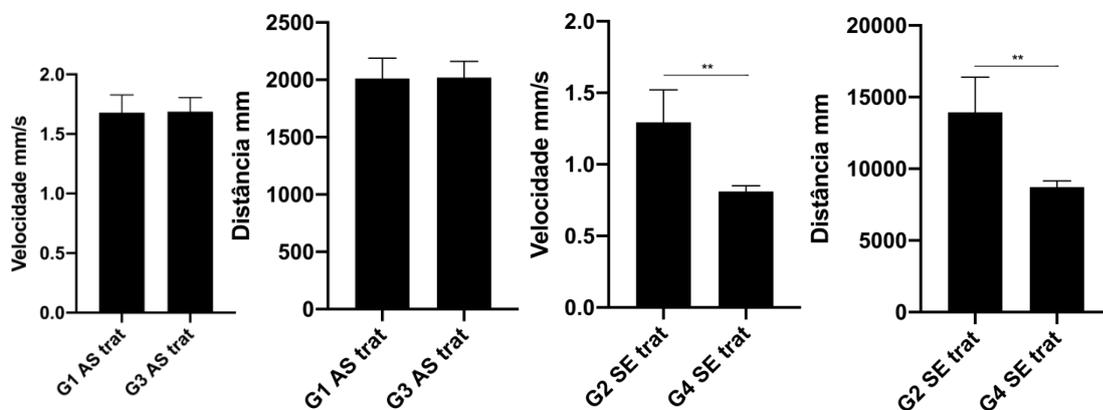


Figura 3: Efeito do tratamento do Azul de Metileno $0,5\mu\text{M}$ por 24h (G1 AS trat e G2 SE trat) e AM $0,1\mu\text{M}$ por 7 dias (G3 AS trat e G4 SE trat) antes da crise epiléptica induzida por PTZ 15mM . A figura mostra os gráficos de Velocidade (mm/s) e Distância (mm) dos grupos: G1 AS trat vs G3 AS trat. G2 SE trat vs G4 SE trat. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão; $n=6$. A diferença estatística foi determinada por Teste t. AS= Grupo submetido a crise epiléptica aguda, 20 minutos. SE= Grupo submetido a crise epiléptica SE-like, 3 horas. Ctrl=controle. Trat=tratamento.

Não houve diferença significativa na comparação G1 AS trat vs G3 AS trat. Foi encontrada diferença significativa quando comparamos G2 SE trat vs G4 SE trat (** $p<0,01$). Ambos os grupos foram submetidos ao protocolo SE-like de indução de crise epiléptica no 7dpf, mas o observado foi que os animais tratados com baixa concentração de AM ao longo de 7 dias (G4 SE trat), demonstrou menor impacto comportamental em relação aos animais que foram exposto apenas por 24h, mesmo que em concentração maior.

Análise Molecular

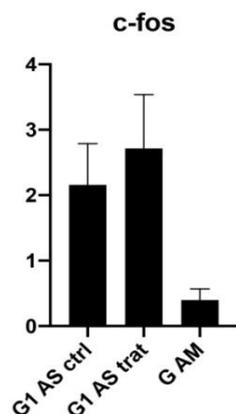


Figura 4: A figura mostra o gráfico de análise quantitativa qPCR para o gene c-fos após foldchange com o gene normalizador ef1a para os grupos G1 AS ctrl, G1 AS trat e G AM após tratamento do Azul de Metileno 0,5 μ M por 24 horas antes da crise epiléptica induzida por PTZ 15mM. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão; n=6. A diferença estatística foi determinada por Anova de uma via. AS= Grupo submetido a crise epiléptica aguda, 20 minutos. AM= azul de metileno. Ctrl=controle. Trat=tratamento.

Não foi observada diferença significativa quando comparados os 3 grupos: G1 AS ctrl, G1 AS trat e G AM.

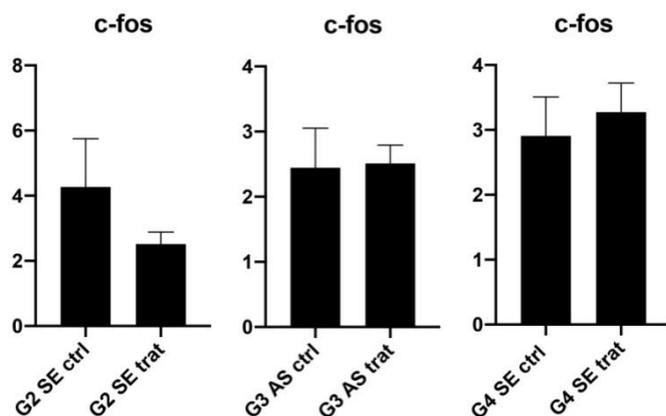


Figura 5: A figura mostra o gráfico de análise quantitativa qPCR para o gene c-fos após foldchange com o gene normalizador ef1a para o grupo G2 SE trat vs G2 SE ctrl após tratamento do Azul de Metileno 0,5 μ M por 24 horas antes da crise epiléptica induzida por PTZ 15mM. E após tratamento com Azul de Metileno 0,1 μ M por 7 dias antes da crise epiléptica induzida por PTZ 15m para os grupos G3 AS trat vs G3 AS ctrl e G4 SE trat vs G4 SE ctrl. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão; n=6. A diferença estatística foi determinada por Teste t. AS= Grupo submetido a crise epiléptica aguda, 20 minutos. SE= Grupo submetido a crise epiléptica SE-like, 3 horas.

Não foi encontrada diferença significativa quando comparados G2 SE trat vs G2 SE ctrl, G3 AS trat vs G3 AS ctrl e G4 SE trat vs G4 SE ctrl.

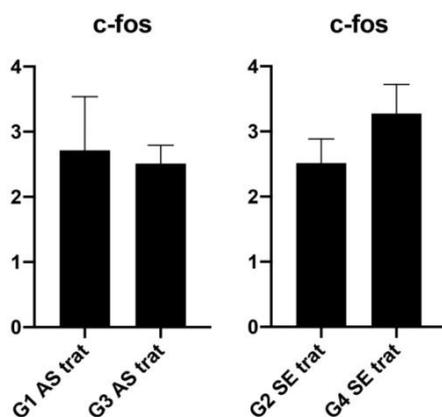


Figura 6: A figura mostra o gráfico de análise quantitativa qPCR para o gene c-fos após foldchange com o gene normalizador ef1a após tratamento do Azul de 0,5 μ M por 24h (G1 AS trat e G2 AS trat). E após tratamento de 0,1 μ M de AM por 7 dias (G3 AS trat e G4 SE trat) antes da crise epiléptica induzida por PTZ 15mM. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão; n=6. A diferença estatística foi determinada por Teste t. AS= Grupo submetido a crise epiléptica aguda, 20 minutos. SE= Grupo submetido a crise epiléptica SE-like, 3 horas. Ctrl=controle. Trat=tratamento.

Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos com indução de crise epiléptica aguda e SE-like, mas que receberam tratamento com AM por tempo e concentrações diferentes: (G1 AS trat vs G3 AS trat) (G2 SE trat vs G4 SE trat).

Discussão

Com esses dados preliminares, podemos inferir que o Azul de Metileno (AM) não modificou de forma significativa a expressão do gene *c-fos* em nenhum dos grupos analisados, ou seja, o AM não interfere na atividade neuronal durante as crises epiléticas. No entanto, como dito anteriormente ainda precisamos analisar os outros genes (*sod2*, *casp3* e *bcl2*) que são relacionados às vias de oxidação e apoptose antes de podermos afirmar que o AM não apresenta interferência nas vias moleculares.

De forma geral, para as condições analisadas, nossos dados apontam que o AM teve um impacto positivo somente para uma condição específica: quando comparamos o comportamento de animais de 7dpf induzidos ao SE (uma condição grave de insulto), e que foram submetidos a uma baixa concentração de AM (0,1 μ M) por tempo prolongado. Outras análises serão importantes para melhor compreendermos o impacto do AM no cérebro do zebrafish induzido a crises epiléticas.

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. Pentylentetrazole 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.