



Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Ciências Médicas

Departamento de Genética Médica

Projeto: Adaptação e implementação do *Laser Speckle Contrast Imaging* para estudos funcionais do cérebro do *zebrafish*

Bolsista: Isabella Cotta Galvão RA: 199200

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli

Co-autores: Thatiane Cristina de Moura, Giovanni Hering Scavariello, Prof. Dr. Rickson Coelho Mesquita

O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um organismo modelo que vem sendo cada vez mais utilizado em laboratórios, especialmente no estudo da biologia do desenvolvimento e da genética (STEWART et al.; KALUEFF, 2014). Várias são as vantagens de seu uso: seu desenvolvimento é externo e seus embriões são transparentes, o que permite melhor visualização e análise visual de processos da embriogênese (LIESCHKE et al., 2007). É possível armazenar um grande número de espécimes em um espaço relativamente pequeno, uma vez que os indivíduos adultos medem cerca de apenas seis centímetros e que cada casal é capaz de fecundar de 200 a 300 ovos por semana (KALUEFF et al., 2014). Assim, a alta fecundidade, aliada a um rápido ciclo de vida, facilitam os mapeamentos genéticos (DOOLEY; ZON, 2000). Além disso, o genoma do animal apresenta cerca de 70% de homologia com o genoma humano e seus genes exibem paralelo com 84% dos genes que causam doenças em humanos (BASNET et al., 2017, GUNNARSSON et. al, 2008, HOWE et al., 2013), justificando seu uso para o estudo de várias patologias que acometem o homem.

O aumento do uso do modelo *zebrafish* em pesquisas propiciou que muitas técnicas experimentais fossem criadas ou adaptadas para tirar vantagem das características inerentes a esse

pequeno peixe. Uma dessas técnicas, relativamente nova, mas com grande potencial para uso no *zebrafish*, é a Laser Contrast Speckle Imaging (LCSI). No entanto, para que isso seja possível é preciso adaptá-lo para o diminuto tamanho de uma larva de *zebrafish* que mede em torno de 0,5mm.

No LSCI, ao iluminar um tecido com uma luz coerente (como a do laser) é formado no detector um padrão de interferência, o chamado *speckle*. Basicamente, a técnica monitora alterações espaciais e temporais no cérebro usando o fluxo sanguíneo baseando-se nas mudanças dinâmicas na luz retroespalhada como resultado de sua interação com os glóbulos vermelhos (HEEMAN et al., 2019) (Exemplo de imagens Figuras 2 e 3). A partir de alterações no fluxo sanguíneo, pode-se fazer inferências acerca da atividade cerebral.

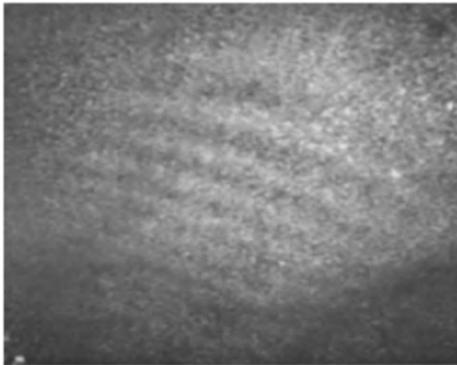


Figura 1– Padrão de *speckle* formado a partir da iluminação do córtex cerebral de um rato. Figura retirada de (BOAS, 2010).

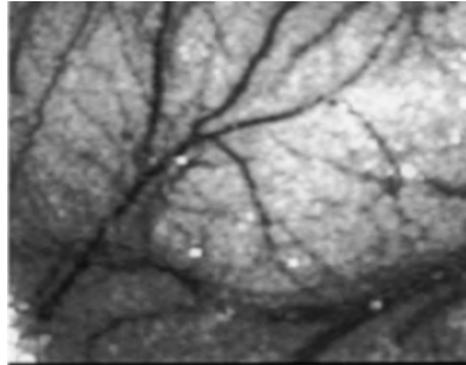


Figura 2 – Contraste de *speckle* calculado a partir de imagens da Figura 2. Figura retirada de (BOAS, 2010).

Essa técnica apresenta muitas vantagens e até agora não há conhecimento sobre sua utilização no peixe. É uma técnica relativamente simples e barata: os equipamentos permitem a obtenção de uma imagem com um campo amplo e sem contato do fluxo sanguíneo cerebral, sem a necessidade de varredura. Além disso, os instrumentos utilizados no sistema são simples, facilitando sua construção e uso (BOAS; DUNN, 2010). Também, é uma técnica que independe de animais transgênicos, o que amplia a sua utilização. O campo de visão também pode sofrer variação de escala sem perda da resolução espacial. Com a câmera e análise corretas, a resolução temporal também é adequada para capturar a dinâmica do fluxo sanguíneo cerebral. As informações de perfusão vêm de áreas maiores do que apenas a área de superfície uma vez que, apesar das imagens serem de um plano focal 2D, o volume efetivo de interação da luz é muito

maior. O laser utiliza comprimentos de onda no vermelho e infravermelho próximos e, em última análise, interage com a amostra de forma apenas reflexiva, maximizando a quantidade de luz espalhada. Dessa forma, a deposição de energia no tecido é pequena, minimizando efeitos fisiológicos adversos (KAZMI et al., 2015).

Entretanto, como toda técnica, esta também possui algumas limitações. Suas desvantagens giram em torno da ambiguidade na especificidade espacial, o que pode gerar incertezas na obtenção das medidas absolutas do fluxo sanguíneo cerebral, especialmente em regiões cerebrais mais profundas. Algumas calibrações podem ser necessárias, e as análises são auxiliadas pela caracterização detalhada da arquitetura vascular tridimensional da amostra. Além disso, muitas vezes ocorrem artefatos devido ao movimento dos animais, mesmo em animais anestesiados, mas que geralmente podem ser controlados ou corrigidos. (KAZMI et al., 2015). É importante lembrar que essa técnica, diferentemente de muitas outras destinadas às análises funcionais, se propõe a apenas medir o fluxo sanguíneo e, portanto, é uma técnica mais simples que não permite medir aspectos específicos dos neurônios (e.g. caracterizar populações de neurônios que utilizam um determinado neurotransmissor), como as técnicas que utilizam o calcium imaging, por exemplo.

Por ser uma técnica simples e barata, e que minimiza efeitos colaterais na fisiologia do animal, ela se apresenta como uma ótima opção em estudos de perfusão. Ela permite investigar diferentes aspectos de patologias, incluindo aqui, estudos em epilepsia, onde permitem verificar a perfusão tecidual e mostrar o impacto de um evento no tecido examinado, como por áreas cerebrais afetadas durante e após crises epilépticas. Dessa forma, o Laser Contrast Speckle Imaging (LSCI) tem um potencial imenso para estudos funcionais do cérebro do *zebrafish*, podendo incrementar os estudos que desenvolvemos relacionados às epilepsias, a triagem de novos compostos para supressão de crises epilépticas e, também, abrir campo para investigações de outras doenças do cérebro. Dessa forma, esse estudo procurou adaptar e implementar o LSCI como uma nova ferramenta para estudos funcionais do cérebro do *zebrafish* e realizar estudos em animais induzidos às crises epilépticas.

Inicialmente, realizamos a montagem de um setup experimental para obtenção das imagens. Para isso, após vários testes, discutiu-se que uma possibilidade de sucesso seria a construção de uma câmera a partir de uma *webcam* (Figura 3). Para os testes de materiais para a

imobilização dos animais, um outro ponto crítico desse projeto, iniciamos com a técnica de agarose 1,2%, mesma concentração utilizada previamente no laboratório para realização de eletroencefalogramas (EEGs). A fim de gerar um padrão de luz espalhada foi desenvolvido uma placa com LED emitindo luz na região espectral do vermelho ou infravermelho. Em seguida, foi construído um circuito contendo uma resistência em série com o LED, a fim de obter um valor de corrente para o qual a intensidade da luz não saturasse o detector (câmera) (Figura 3).



Figura 3 - (esquerda): Montagem experimental da camera desenvolvida a partir da webcam. Figura 2 (centro): imobilização da larva (indicada pela seta) em solução de 1,2% de agarose. Figura 3 (direita): circuito criado contendo uma resistência em série com a luz LED.

Ao final dos testes, obtivemos sucesso na montagem do setup, restando apenas alguns ajustes finos de imagem para efetuar a análise. Contudo, a pandemia do COVID-19 forçou a parada de todas as atividades de pesquisas não essenciais. No entanto, pretendemos concluir os estudos funcionais usando o LCSi, tão logo nos seja possível, pois acreditamos no potencial dessa técnica.

Discussão

O zebrafish é um animal muito vantajoso para estudos experimentais que incluem as técnicas de obtenção de imagens, especialmente por sua transparência óptica durante parte de seu desenvolvimento. Existem diversas técnicas, cada uma com seu propósito, assim como um conjunto próprio de vantagens e desvantagens. O conhecimento sobre aplicações, vantagens e limitações de diferentes técnicas de imageamento funcional voltado para o modelo do zebrafish permite não somente a escolha da melhor técnica para o objetivo do estudo, mas também, a combinação de técnicas que podem potencializar os dados obtidos (ABU-SINIYEH; AL-ZYOUND, 2020). A quarentena não nos permitiu concluir os estudos funcionais usando o LCSi dimensionado para o zebrafish (algo que pretendemos fazer tão logo nos seja possível), mas uma revisão teórica realizada sobre métodos de imageamento funcional do cérebro do zebrafish reforçou a hipótese de

que o LCSi surge como uma excelente alternativa para essa abordagem, e que sua implementação para os estudos que realizamos com modelos de epilepsia e de crises epilépticas induzidas será um ganho para nossas pesquisas.

Referências:

BASNET et al., 2017:

Basnet, R.M., Guarienti, M., Memo, M. Zebrafish embryo as an in vivo model for behavioral and pharmacological characterization of methylxanthine drugs. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. 18: 596.

BOAS; DUNN, 2010:

Boas, A.D., Dunn, A.K.. Laser Speckle Contrast Imaging in Biomedical Optics. *Journal of Biomedical Optics*. 2010. 15: 011109

DOOLEY; ZON, 2000:

Dooley, K., Zon, L.I.. Zebrafish: A model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2000. 10: 252-256.

GUNNARSSON et al., 2008:

Gunnarsson, L.; Jauhiainen, A.; Kristiansson, E.; Nerman, O.; Larsson, D.G.. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42, 5807–5813

HEEMAN et al., 2019:

Heeman, W. et al. Clinical applications of laser speckle contrast imaging: a review. *Journal of Biomedical Optics*. 2019. 24: 1.

HOWE et al., 2013:

Howe, K.; Clark, M.D.; Torroja, C.F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J.E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013. 496: 408–503

KALUEFF, 2014:

Kalueff, A.V., Echevarria, D.J., Stewart, A.M.. Gaining translational momentum: more zebrafish models for neuroscience research. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2014. 55: 1-6.

KAZMI et al., 2015:

Kazmi, S.M.S. et al. Expanding applications, accuracy, and interpretation of laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2015. 35: 1076–1084.

LIESCHKE et al., 2007:

Lieschke, Graham J., Currie, Peter D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Review Genetics*. 2007. 8: 353-367.

STEWART et al., 2014:

Stewart, A.M, Braucbach, O., Spitsbergen, J., Robert, G., Kalueff, A.V.. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends in Neuroscience*. 2014. 37: 264- 278.