

Análise Temporal dos Transcritos dos Genes *bdnf* e *nrk2* em Cérebro de Zebrafish Induzido à Crise Epiléptica por Pentilenotetrazol

Fernanda Christina Reis-Pinto, Patrícia Gonçalves Barbalho, Rafael Felipe Pires Mangolin, Cláudia Vianna Maurer-Morelli

Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

RESUMO

Objetivo: Investigar o perfil temporal de transcritos dos genes *bdnf*, *nrk2a* e *nrk2b* em cérebro de zebrafish após crise epiléptica induzida por Pentilenotetrazol (PTZ). **Metodologia:** Os animais foram divididos em Grupo PTZ (induzidos à crise epiléptica com PTZ 15mM) e Grupo Controle (animais sem crise epiléptica) e seus cérebros coletados nos tempos: 0h, 12h, 24h, 48h, 72h pós-crise. Reações de transcriptase reversa-PCR quantitativa foram realizadas com os controles endógenos *18s* e *ef1a* usando-se o sistema TaqMan™ (*Applied Biosystems, Foster City*). A quantificação relativa foi calculada pela equação $QR=2^{-\Delta\Delta CT}$ e a significância estatística dada pelo teste Kruskal-Wallis ($p\leq 0,05$). **Resultados:** No grupo PTZ houve um aumento significativo dos níveis de RNAm do gene *bdnf* no tempo 0h ($p=0,017$). O aumento de transcritos encontrado nos outros tempos não foi significativo ($p>0,05$). **Conclusão:** Nossos resultados mostraram que a indução de crise epiléptica alterou o padrão de transcrito do gene *bdnf* no cérebro do zebrafish como visto em outros modelos animais e em humanos, porém em um padrão temporal diferente. Este é o primeiro estudo que descreve o perfil temporal de transcritos *bdnf/nrk2* em cérebro de zebrafish após crise epiléptica e contribui para a caracterização deste pequeno peixe como modelo de estudo em epilepsias.

Unitermos: epilepsia; zebrafish; *bdnf*; Pentilenotetrazol e PCR quantitativa.

ABSTRACT

Temporal transcript profile of bdnf, nrk2a and nrk2b genes in zebrafish brain after Pentilenotetrazole (PTZ)-induced seizure

Objective: The main aim of this study was to investigate the transcript profile of *bdnf*, *nrk2a* and *nrk2b* genes in adult zebrafish brain after Pentilenotetrazole (PTZ)-induced seizure. **Methods:** Zebrafish were separated in PTZ (seizure-induced) and Control (no seizure) groups. At 0h, 12h, 24h, 48h and 72h after seizure, animals were anesthetized and their brains were immediately collected for RNA extraction. Reverse transcriptase quantitative-PCRs were carried out with *18S* and *ef1a* as endogenous control using TaqMan™ System (*Applied Biosystems, Foster City*). The relative quantification was calculated by the equation $RQ=2^{-\Delta\Delta CT}$. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test ($p\leq 0.05$). **Results:** Comparisons between both groups showed an increase of *bdnf* mRNA levels in the PTZ group at 0h after seizure ($p= 0.017$). No statistical significance was found in other times investigated ($p>0.05$). **Conclusions:** Our results showed an up-regulation of the transcript levels of *bdnf* gene in zebrafish brain after seizure as seems in other models and humans, but in a different pattern. This is the first study investigating temporal pattern of *bdnf*, *nrk2a* and *nrk2b* genes in zebrafish brain after a seizure and contributes to characterize it as a model for epilepsy studies.

Keywords: epilepsy; zebrafish; *bdnf*; Pentilenotetrazole and quantitative PCR.

INTRODUÇÃO

O uso de modelos animais tem trazido grandes benefícios para uma maior compreensão das doenças humanas, inclusive as epilepsias. Dentro deste contexto, o *Danio rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish* ou peixe paulistinha, tem se estabelecido como um modelo promissor no estudo das epilepsias, mas ainda pouco explorado.

Como vertebrado, o *zebrafish* possui diversos processos biológicos comparáveis aos mamíferos tais como: desenvolvimento, conservada organização de órgãos e tecidos (incluindo o sistema nervoso), fisiologia, comportamento e genoma¹⁻⁴. Em relação ao genoma, o *zebrafish* possui 80% de homologia com o genoma humano, além de conservada sintenia^{2,5,6}. É importante destacar que o genoma deste peixe sofreu duplicação parcial de aproximadamente 20% de seus genes^{1,7,8}. Esse fato faz com que estudos genéticos neste animal devam levar em consideração à investigação de ambas as cópias quando o gene de interesse estiver duplicado.

Devido às suas características, o *zebrafish* foi recentemente proposto como um modelo para estudos das epilepsias⁹. No estudo de Baraban e colaboradores (2005), larvas de *zebrafish* com 7 dias pós-fertilização foram quimicamente induzidas à crises epiléticas por Pentilenotetrazol (PTZ) na concentração 15mM e, investigados o comportamento, a atividade neural, os níveis de RNAm do gene *c-fos* (um conhecido marcador de atividade neuronal) e a supressão dos padrões eletrográficos por drogas antiepiléticas⁹. Depois desta descrição, o modelo do *zebrafish* também tem sido usado para manipulações de genes candidatos para as epilepsias, fazendo dele um modelo promissor para o estudo dessas condições¹⁰⁻¹².

Apesar destas publicações, pouco se sabe sobre as alterações que ocorrem no cérebro do *zebrafish* após a indução de crises epiléticas. As investigações de eventos já conhecidos e descritos em outros modelos animais de epilepsia certamente contribuem para uma melhor caracterização do *zebrafish* como modelo de epilepsia *per se* e melhora a interpretação de dados obtidos por meio deste organismo. Diferentes estudos mostraram um aumento nos níveis de transcritos e protéicos do *BDNF* (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) e seu receptor *TRKB* (do inglês *Tropomyosin-related kinase type B*) em modelos animais de epilepsia¹³.

O *BDNF* faz parte da família das neurotrofinas e está bem estabelecido o seu papel durante o desenvolvimento através da promoção da sobrevivência e diferenciação neuronal, além de regular a transmissão e a plasticidade sináptica em adultos, contribuindo com vários processos neuronais adaptativos bem como doenças no sistema ner-

voso central (SNC)^{14,15}. De fato, o *BDNF* parece ser parte de um mecanismo de modificação de sinapses no SNC que está implicado na cascata de mudanças comportamentais e eletrofisiológicas que permeiam o estado epilético^{16,17}. Apesar dos estudos em outros modelos de epilepsia, não há relatos sobre o padrão de expressão das neurotrofinas pós-criises epiléticas em *zebrafish*. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi investigar o perfil temporal de transcritos dos genes *bdnf*, *ntrk2a* e *ntrk2b* após crise epilética induzida por PTZ.

METODOLOGIA

Manutenção e tratamento dos animais

Os peixes adultos foram adquiridos em lojas convencionais e passaram por um período de quarentena em aquários com uma população máxima de três peixes por litro de água, antes de serem usados na experimentação. As condições de manutenção e cuidados foram em acordo com Westerfield¹⁸.

Para a experimentação, os animais foram divididos em dois grupos: (i) PTZ – animais induzidos à crise epilética pelo agente convulsivante PTZ e (ii) CNT – animais controle sem crise epilética. Animais do grupo PTZ foram transferidos individualmente para um *becker* de vidro contendo 15mM de PTZ em volume final de 200ml por 2-3 minutos e observadas as três fases comportamentais descritas por Baraban e colaboradores⁹. É importante salientar que foram considerados na experimentação, somente os animais que apresentaram as três fases comportamentais já estabelecidas⁹. Os animais do grupo CNT foram submetidos à mesma manipulação, mas em água livre de PTZ. Após a manipulação, os animais foram colocados em aquários livres de PTZ, de acordo com seu grupo de estudo (PTZ ou CNT). Nos tempos zero (0h), 12h, 24h, 48h e 72h pós-crise epilética (PTZ) ou pós-manipulação (CNT), os animais foram crioadestesiados e seus cérebros coletados para a investigação de transcritos por PCR em Tempo Real. Cada tempo de investigação foi composto por um n=3 (6 cérebros). Um *pool* de dois cérebros foi usado para compor uma amostra. Devido a heterogeneidade entre os animais, um segundo conjunto independente de animais também foi dividido em grupo PTZ e CNT (nomeado de experimento 2) e manipulados da mesma forma que o primeiro (nomeado de experimento 1). Portanto, neste estudo foram realizados dois conjuntos independentes para o mesmo tratamento e aquisição de cérebros. Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNICAMP.

Análise molecular dos genes *bdnf* e *ntkr2*

A extração do RNA total do cérebro de todos os animais foi realizada pelo método TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante (1ml do reagente para cada 100mg de tecido). A concentração do RNA total extraído de cada amostra foi medida por espectroscopia em equipamento NanoVue (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e a qualidade do RNA checada por eletroforese em gel de agarose. Foi empregada a técnica da transcriptase reversa-PCR quantitativa (RT-qPCR) usando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems, Foster City) em equipamento de Real Time 7500 (Applied Biosystems, Foster City) para a análise do perfil de transcritos dos genes *bdnf*, *ntkr2a* e *ntkr2b*. As corridas foram em triplicatas usando os genes *18S* e *ef1a* como controles endógenos. A quantificação relativa (QR) foi determinada pela equação $QR = 2^{-\Delta\Delta C_T^{19}}$ e para a análise de significância do perfil dos transcritos foi empregado o

teste de *Kruskal-Wallis*, sendo considerado significativo um $p \leq 0,05$. Para a confecção dos gráficos das Figuras 1 e 2 foi considerada a média dos valores do QR ($QR_{méd}$) e as barras de erro dadas pelos valores QR máximo ($QR_{max} - QR_{méd}$) e QR mínimo ($QR_{méd} - QR_{min}$).

RESULTADOS

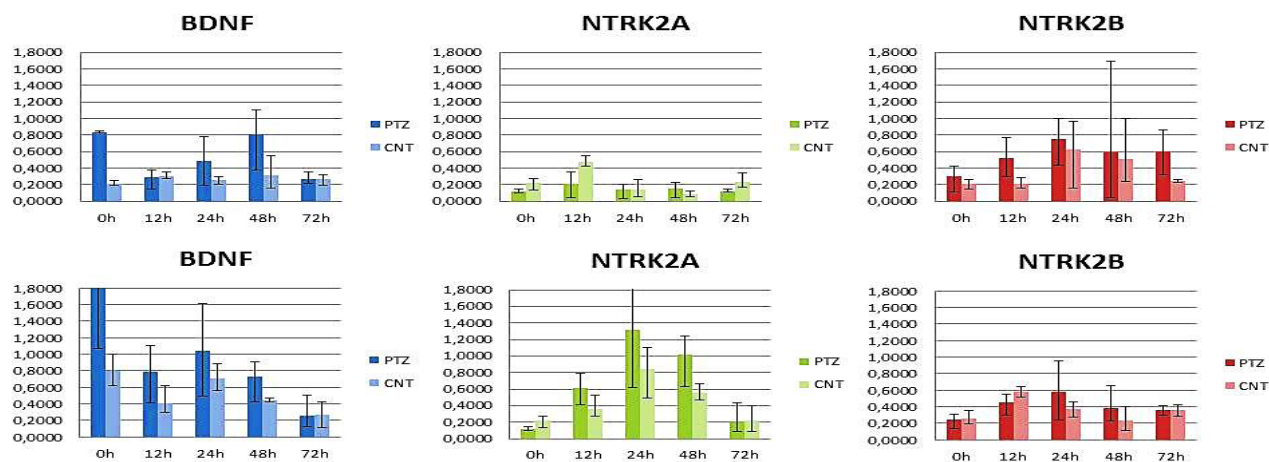
Os peixes adultos foram expostos por um período de 2-3 minutos ao PTZ 15mM e observada as três fases da crise epiléptica descritas em larvas por Baraban e colaboradores⁹, resumidamente: (i) Fase 1 - aumento da atividade do nado; (ii) Fase 2 - movimentos vigorosos, circulares e verticais; (iii) Fase 3 - movimentos estereotipados mimetizando crise tônico-clônica com posterior perda de postura. As médias da quantificação relativa obtidas com a análise dos transcritos para cada gene e tempo de ambos os conjuntos de experimentação (experimento 1 e 2) estão resumidos nas Tabelas 1 e 2:

Tabela 1. Média da quantificação relativa (QR) dos genes *bdnf*, *ntkr2a* e *ntkr2b* para o controle endógeno *18S* nos diferentes tempos pós crise epiléptica induzida por PTZ.

Gene	Tempo	Grupo	Experimento 1			Experimento 2			
			QR média	QR mín	QR máx	QR média	QR mín	QR máx	
<i>bdnf</i>	0h	PTZ	0,832	0,007	0,013	2,993	1,922	3,034	
		CNT	0,214	0,02	0,037	0,795	0,172	0,205	
	12h	PTZ	0,289	0,148	0,089	0,792	0,383	0,310	
		CNT	0,307	0,031	0,044	0,409	0,110	0,206	
	24h	PTZ	0,487	0,29	0,292	1,042	0,550	0,569	
		CNT	0,256	0,048	0,045	0,704	0,146	0,178	
	48h	PTZ	0,808	0,428	0,298	0,734	0,314	0,174	
		CNT	0,320	0,166	0,233	0,438	0,015	0,027	
	72h	PTZ	0,266	0,055	0,091	0,252	0,130	0,254	
		CNT	0,263	0,075	0,057	0,264	0,155	0,157	
	<i>ntkr2a</i>	0h	PTZ	0,122	0,021	0,023	0,122	0,021	0,023
			CNT	0,220	0,089	0,048	0,220	0,089	0,048
12h		PTZ	0,207	0,158	0,147	0,608	0,199	0,180	
		CNT	0,475	0,047	0,071	0,360	0,090	0,173	
24h		PTZ	0,138	0,104	0,071	1,316	0,700	0,601	
		CNT	0,138	0,081	0,125	0,849	0,355	0,252	
48h		PTZ	0,147	0,107	0,079	1,021	0,387	0,223	
		CNT	0,086	0,030	0,042	0,560	0,090	0,105	
72h		PTZ	0,123	0,012	0,019	0,204	0,117	0,232	
		CNT	0,239	0,070	0,110	0,217	0,128	0,183	
<i>ntkr2b</i>		0h	PTZ	0,243	0,107	0,066	0,122	0,021	0,023
			CNT	0,253	0,055	0,106	0,220	0,089	0,048
	12h	PTZ	0,453	0,159	0,100	0,608	0,199	0,180	
		CNT	0,577	0,056	0,062	0,360	0,090	0,173	
	24h	PTZ	0,575	0,337	0,382	1,316	0,700	0,601	
		CNT	0,367	0,090	0,094	0,849	0,355	0,252	
	48h	PTZ	0,388	0,163	0,265	1,021	0,387	0,223	
		CNT	0,232	0,120	0,166	0,560	0,090	0,105	
	72h	PTZ	0,360	0,058	0,052	0,204	0,117	0,232	
		CNT	0,357	0,068	0,066	0,217	0,128	0,183	

Tabela 2. Média da quantificação relativa (QR) dos genes *bdnf*, *ntrk2a* e *ntrk2b* para o controle endógeno *ef1a* nos diferentes tempos pós crise epiléptica induzida por PTZ.

Gene	Tempo	Grupo	Experimento 1			Experimento 2			
			QR média	QR mín	QR máx	QR média	QR mín	QR máx	
<i>bdnf</i>	0h	PTZ	1,352	0,369	0,229	0,251	0,062	0,072	
		CNT	0,247	0,049	0,047	0,312	0,143	0,256	
	12h	PTZ	0,429	0,168	0,087	0,183	0,050	0,053	
		CNT	0,158	0,044	0,085	0,131	0,038	0,054	
	24h	PTZ	0,871	0,323	0,274	0,248	0,041	0,060	
		CNT	0,604	0,447	0,270	0,296	0,049	0,066	
	48h	PTZ	0,639	0,385	0,724	0,217	0,043	0,056	
		CNT	0,800	0,280	0,200	0,218	0,070	0,088	
	72h	PTZ	0,628	0,292	0,417	0,163	0,037	0,052	
		CNT	0,243	0,009	0,011	0,193	0,069	0,041	
	<i>ntrk2a</i>	0h	PTZ	0,255	0,027	0,026	0,313	0,053	0,062
			CNT	0,322	0,058	0,033	0,490	0,263	0,510
12h		PTZ	0,327	0,092	0,068	0,198	0,072	0,042	
		CNT	0,313	0,072	0,101	0,154	0,047	0,059	
24h		PTZ	0,282	0,019	0,032	0,417	0,073	0,070	
		CNT	0,285	0,074	0,074	0,462	0,133	0,076	
48h		PTZ	0,113	0,049	0,081	0,405	0,093	0,091	
		CNT	0,301	0,048	0,040	0,373	0,157	0,151	
72h		PTZ	0,367	0,143	0,081	0,167	0,054	0,078	
		CNT	0,288	0,050	0,059	0,204	0,071	0,092	
<i>ntrk2b</i>		0h	PTZ	0,302	0,185	0,125	0,165	0,093	0,105
			CNT	0,206	0,061	0,051	0,330	0,167	0,326
	12h	PTZ	0,522	0,224	0,243	0,126	0,056	0,035	
		CNT	0,208	0,049	0,077	0,114	0,064	0,044	
	24h	PTZ	0,747	0,316	0,249	0,159	0,024	0,026	
		CNT	0,623	0,465	0,341	0,155	0,044	0,026	
	48h	PTZ	0,595	0,551	1,091	0,138	0,021	0,026	
		CNT	0,505	0,263	0,495	0,110	0,042	0,037	
	72h	PTZ	0,604	0,287	0,263	0,106	0,049	0,052	
		CNT	0,240	0,011	0,018	0,124	0,043	0,057	

**Figura 1.** Análise dos transcritos dos genes *bdnf*, *ntrk2a* e *ntrk2b* em cérebro adulto de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por Pentilenotetrazol comparado com o grupo controle (sem crise epiléptica). Os genes alvos foram normalizados com o controle endógeno *18S*. Na linha superior, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e na linha inferior, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. Cada tempo é representado por um n=3 (6 cérebros). O eixo y é a média dos valores da quantificação relativa (QR) e as barras de erro representam os valores de $QR_{\min/\max}$.

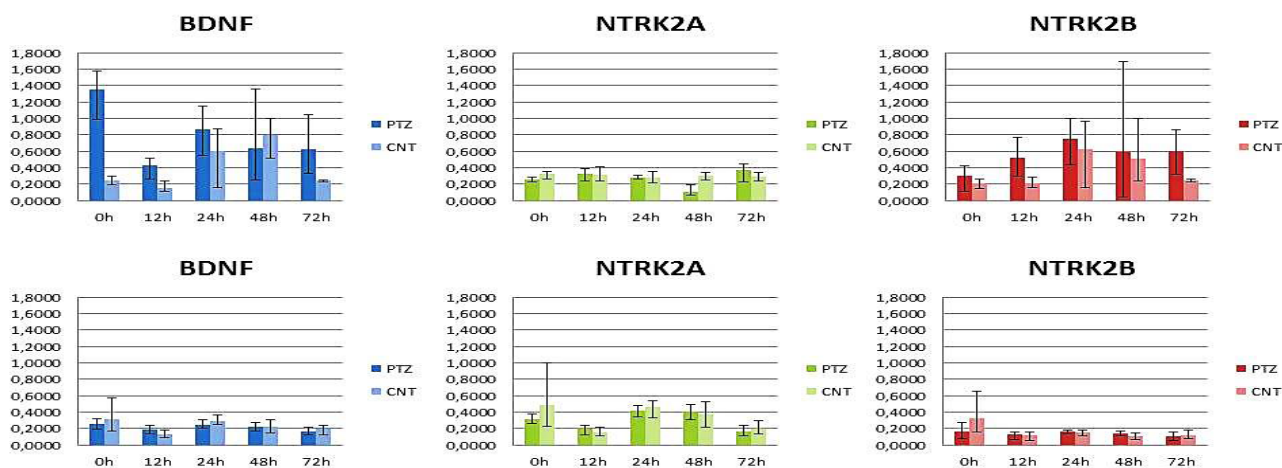


Figura 2. Análise dos transcritos dos genes *bdnf*, *ntrk2a* e *ntrk2b* em cérebro adulto de *zebrafish* em diferentes tempos após crise epiléptica induzida por Pentilenotetrazol comparado com o grupo controle (sem crise epiléptica). Os genes alvos foram normalizados com o controle endógeno *ef1a*. Na linha superior, os resultados obtidos com animais do experimento 1 e na linha inferior, os resultados obtidos com os animais do experimento 2. Cada tempo é representado por um n=3 (6 cérebros). O eixo y é a média dos valores da quantificação relativa (QR) e as barras de erro representam os valores de QR_{min/max}.

Na visualização gráfica destes resultados (Figuras 1 e 2) pode-se observar um aumento dos transcritos do gene *bdnf* no grupo PTZ em comparação ao grupo CNT no tempo 0h ($p = 0.017$) após as crises epilépticas, mas, se comparados com os receptores *ntrk2a* e *ntrk2b*, os mesmos não acompanham esse aumento. Nos tempos 12h, 24h e 48h é possível ver que há um aumento dos níveis de RNAm do gene *bdnf* e seus receptores no grupo PTZ, mas que não foi estatisticamente significativo ($p > 0.05$). Nenhuma diferença de aumento foi encontrado no tempo 72h entre ambos os grupos.

DISCUSSÃO

A sinalização *BDNF/NTRK2* tem sido implicada na epileptogênese²⁰, assim como o aumento dos níveis de RNAm e protéticos destas neurotrofinas após crise epiléptica tem sido descrito em diferentes modelos animais¹³. No entanto, o impacto de crises epilépticas sobre o perfil de transcritos dos genes *bdnf* e *ntrk2* no cérebro do *zebrafish* ainda não é conhecido.

Porque o gene *ntrk2* é duplicado no *zebrafish*, neste estudo foram investigados ambos os genes, *ntrk2a* e *ntrk2b*, pois os mesmos poderiam apresentar diferentes padrões de expressão^{7,10,11}. Nossos resultados apontam que após a indução de crise epiléptica há um aumento de transcrito em ambos os genes (Figuras 1 e 2), mas indicando que há um aumento preferencial do gene *ntrk2b* (Figuras 1 e 2; Tabelas 1 e 2).

Os resultados obtidos com esse estudo apontam um aumento do RNAm do gene *bdnf* logo após a indução da

crise, no tempo 0h ($p = 0,017$) porém os seus receptores *ntrk2a* e *ntrk2b* não tiveram o mesmo nível de RNAm neste mesmo tempo ($p \geq 0,5$). No entanto, 12h após a indução da crise epiléptica pode-se observar um aumento de RNAm desses receptores (Figuras 1 e 2).

O receptor *NTRK2*, quando ativado pelo *BDNF*, fosforila vias de sinalização de diferenciação e sobrevivência celular e plasticidade^{16,21,22}. O papel do *BDNF* e *NTRK* nas epilepsias ainda é controverso^{23,24}, mas é inquestionável que o padrão de expressão de transcritos e protéticos estão aumentados tanto em espécimes cirúrgicos de pacientes com refratariedade medicamentosa, quanto em diferentes modelos animais de epilepsia²⁴⁻³⁰. Distribuído amplamente no cérebro de roedores adultos, o *BDNF* apresenta níveis mais altos em estruturas associadas com a epilepsia e a plasticidade sináptica, como a formação hipocampal¹⁶. Em ratos, quatro dias após a administração intracerebroventricular de ácido caínico houve um aumento de 179% nos níveis de *BDNF* no hipocampo desses animais. Esse valor diminuiu 98% em 45 dias e 37% em 120 dias após a administração do ácido caínico²⁴. Em outro estudo, Garcia e colaboradores também usando o modelo de ácido caínico em ratos, mostraram por hibridização *in situ* um aumento do *BDNF* nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo uma semana após a injeção do ácido caínico, e principalmente, um aumento dessa neurotrofina na camada de células granulares do giro denteado, duas semanas após a injeção do ácido caínico³⁰.

O aumento estimulado por crise epiléptica com retorno escalonado até aos níveis basais, também pode ser visto no perfil obtido em nosso estudo, ainda que o tempo de

ocorrência seja diferente, revelando-se muito mais curto no caso do peixe (Figuras 1 e 2). O que nos chamou a atenção foi que o padrão do RNAm do *bdnf* tenha tido uma resposta tão intensa no tempo 0h ($p=0,017$), evidenciando um tempo diferente de resposta entre *bdnf* e os receptores *ntkr2* no *zebrafish*. No entanto, é interessante destacar que uma hipótese a ser investigada é a possibilidade de outro receptor com afinidade para o *bdnf* estar aumentando neste momento (tempo 0h), como por exemplo o $p75^{\text{NTR}}$ (*p75 neurotrophin receptor*). Nesse estudo não investigamos o gene $p75^{\text{NTR}}$, mas foi descrito que a expressão deste gene está aumentada em cérebro de rato logo após a indução de crises epiléticas por pilocarpina e que este receptor possivelmente sinaliza vias de apoptose³¹. Apesar da forma madura do BDNF ter baixa afinidade pelo receptor $p75^{\text{NTR}}$, esta poderia ser uma via de ação para o *bdnf* neste tempo 0h,³² mostrando um padrão mais complexo de interação entre neurotrofinas e seus receptores³³.

A indução de crise no grupo PTZ também aumentou os níveis dos transcritos dos genes *bdnf* e *ntkr2b* nos outros tempos investigados, mas esses valores não foram estatisticamente significantes ($p \geq 0,05$). É importante ressaltar que apesar do número de amostras ser representativo (06 cérebros por tempo em cada experimento independente) é possível observar que há variação (representada pelas barras de erro nas Figuras 1 e 2) entre as amostras do mesmo grupo e tempo. Este fator poderia ser o motivo das diferenças não terem sido estatisticamente significantes, apesar do visível aumento dado pelos valores da média da quantificação relativa (Tabelas 1 e 2). Desta forma, poderíamos chamar a atenção e destacar que estudos envolvendo animais adultos fornecidos comercialmente devam aumentar seu tamanho amostral, a fim de minimizar essa variação. Em nosso estudo, além de usarmos dois controles endógenos para a normalização da RT-qPCR, realizamos uma segunda bateria de experimentos (experimento 2) com um grupo independente de animais, que confirmaram os resultados obtidos previamente. Por causa dessa variação, consideramos os dados que foram iguais em pelo menos três, dos quatro resultados obtidos (experimentos 1 e 2 para ambos os controles endógenos). As pequenas diferenças entre o experimento 1 e 2 se devem, provavelmente ao fato dos peixes serem de épocas de quarentenas diferentes.

Este estudo não teve a intenção de responder qualquer controvérsia em relação ao papel das neurotrofinas na epileptogênese, mas sim, verificar se a indução de crise epilética poderia alterar os níveis de transcrito do *bdnf* e seus receptores *ntkr2* no cérebro do *zebrafish* adulto, como é visto em outros modelos animais. Nossos resultados mostraram que embora temporalmente mais curto, o *zebrafish* apresenta uma elevação dos níveis do *bdnf* como visto em outros modelos de epilepsia, mas com um pico de expressão no tempo 0h^{24,30}. Este é o primeiro estudo

que descreve o perfil temporal de transcritos dos genes *bdnf*, *ntkr2a* e *ntkr2b* pós crise epilética e contribui para a caracterização do *zebrafish* como modelo para estudos das epilepsias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro recebido para o desenvolvimento deste estudo: CNPq – processo 475405/2010-2, FAEPEX-PAPDIC – processo 17811.

REFERÊNCIAS

- Shin JT and Fishman MC. From zebrafish to human: modular medical models. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2002;3: 311-40.
- Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD and Johnson SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Research* 2000;10(9):1351-8.
- Dooley K and Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics and Development* 2000;10:252-6.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B and Schilling TF. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamic* 1995;203:253-310.
- Navratilova P and Becker TS. Genomic regulatory blocks in vertebrates and implications in human disease. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2009;8(4):333-42.
- Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, Horne S, Amores A, Brownlie A, Donovan A, Egan ES, Force A, Gong Z, Goutel C, Fritz A, Kelsh R, Knapik E, Liao E, Paw B, Ransom D, Singer A, Thomson M, Abduljabbar TS, Yelick P, Beier D, Joly JS, Larhammar D, Rosa F, Westerfield M, Zon LI, Johnson SL and Talbot WS. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nature Genetics* 1998;18(4):345-9.
- Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, Huang H, Hill-Force A and Talbot WS. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate Chromosomes. *Genome Research* 2000;10:1890-902.
- Robinson-Rechavi M and Laudet V. Evolutionary rates of duplicate genes in fish and mammals. *Molecular Biology and Evolution* 2001; 18(4):681-3.
- Baraban SC, Taylor MR, Castro PA and Baier H. Pentylentetrazole-Induced Changes in Peixe-zebra Behavior, Neural Activity and *c-fos* Expression. *Neuroscience* 2005;131(3):759-68.
- Teng Y, Xie X, Walker S, Rempala G and Kozlowski DJ. Knockdown of zebrafish *Lgi1a* results in abnormal development, brain defects and a seizure-like behavioral phenotype. *Human Molecular Genetics* 2010; 19(22):4409-20.
- Teng Y, Xie X, Walker S, Saxena M, Kozlowski DJ, Mumm JS and Cowell JK. Loss of Zebrafish *lgi1b* Leads to Hydrocephalus and Sensitization to Pentylentetrazole Induced Seizure-Like Behavior. *PLoS One* 2011;6(9):e24596.
- Hortopan GA, Dinday MT and Baraban SC. Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy. *Disease Models & Mechanisms* 2010;3(3-4):144-8.
- Binder DK. The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2004;548:34-56.
- Huang EJ and Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual Review Neuroscience* 2001; 24:677-736.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Katze C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I and Medina JH. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Science* 2008;105(7):2711-6.

16. Binder DK and Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 2004;22:123-31.
17. Kokaia M, Ernfors P, Kokaia Z, Elmér E, Jaenisch R and Lindvall O. Suppressed epileptogenesis in BDNF mutant mice. *Experimental Neurology* 1995;133(2):215-24.
18. Westerfield M. *The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of the zebrafish (Danio rerio)*. 4. ed. Eugene (OR): University of Oregon, Institute of Neuroscience; 2000.
19. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
20. Heinrich C, Lähteinen S, Suzuki F, Anne-Marie L, Huber S, Häussler U, Haas C, Larmet Y, Castren E and Depaulis A. Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease* 2011; 42(1):35-47.
21. Barde YA. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Progress in Clinical and Biological Research* 1994;390: 45-56.
22. Ueyama T, Kawai Y, Nemoto K, Sekimoto M, Toné S and Senba E. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neuroscience Research* 1997;28(2): 103-10.
23. Binder DK, Croll SD, Gall CM and Scharfman HE. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Growth Factors* 2004;22(3): 123-31.
24. Shetty AK, Zaman V and Shetty GA. Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy: a lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting. *Journal of Neurochemistry* 2003;87(1):147-59.
25. Mathern GW, Babb TL, Micevych PE, Blanco CE and Pretorius JK. Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Molecular and Chemical Neuropathology* 1997;30:53-76.
26. Koyama R and Ikegaya Y. To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus. *The Neuroscientist* 2005;11:282-7.
27. Lahteinen S, Pitkanen A, Saarelainen T, Nissinen J, Koponen E and Castren E. Decreased BDNF signalling in transgenic mice reduces epileptogenesis. *European Journal Neuroscience* 2002;15:721-34.
28. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL and Croll SD. Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Experimental Neurology* 2002;174:201-14.
29. Hortopan GA and Baraban SC. Aberrant expression of genes necessary for neuronal development and Notch signaling in an epileptic mind bomb zebrafish. *Developmental Dynamics* 2011;240(8):1964-76.
30. Garcia ML, Garcia VB, Isackson PJ and Windebank AJ. Long-term alterations in growth factor mRNA expression following seizures. *NeuroReport* 1997;8:1445-9.
31. Roux PP, Colicos MA, Barker PA and Kennedy TE. p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *The Journal of Neuroscience* 1999;19(16):6887-96.
32. Holm MM, Nieto-Gonzalez JL, Vardya I, Vaegter CB, Nykjaer A and Jensen K. Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience* 2009;29(40):12412-8.

Endereço para correspondência:

Cláudia Vianna Maurer-Morelli
 Departamento de Genética Médica – Faculdade de Ciências Médicas
 Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cidade Universitária “Zeferino Vaz”
 CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil