

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Curso de Graduação em Biomedicina

Lauryn da Silva Barreto

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO PROTETOR DA MANGIFERINA NO MODELO  
DE CRISE EPILÉPTICA INDUZIDO PELO ÁCIDO CAÍNICO EM PEIXE-ZEBRA  
ADULTO

Porto Alegre

DEZEMBRO/2013

LAURYN DA SILVA BARRETO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO PROTETOR DA MANGIFERINA NO  
MODELO DE CRISE EPILÉPTICA INDUZIDO PELO ÁCIDO CAÍNICO EM  
PEIXE-ZEBRA ADULTO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre

DEZEMBRO/2013

## **AGRADECIMENTOS:**

Ao meu orientador Diogo Losch de Oliveira e ao Eduardo Pacheco Rico que me receberam no laboratório para a realização do meu trabalho de conclusão.

Ao colegas do laboratório 24, principalmente ao Ben Hur, Luana e Suelen que me auxiliaram na realização desse trabalho.

Às minhas colegas Clarissa, Luciana, Mariana Günther, Mariana Santos e Natully.

Aos meus amigos Flávia, Fabiano, Júlia, Luísa, Natália e Renata.

À minha família, pois sem ela eu não chegaria até aqui, e ao meu namorado Leonardo que esteve ao meu lado durante a maior parte da minha graduação.

## RESUMO

A epilepsia é um distúrbio que se caracteriza por crises epiléticas recorrentes e espontâneas decorrentes de descargas neuronais anormais. Grande parte do nosso entendimento a respeito desse distúrbio se deu graças aos estudos em modelos de indução de crises por agentes químicos, tais como ácido caínico (AC), pilocarpina e pentilenotetrazol (PTZ). O uso dos modelos em roedores para *screening* de novas substâncias anticonvulsivas eleva o custo final de desenvolvimento de fármacos. Por isso o peixe-zebra vem se tornando um modelo animal complementar aos roedores, devido ao rápido desenvolvimento, o pequeno espaço requerido para manutenção e baixo custo por animal. A mangiferina é um ingrediente ativo do Vimang®, um extrato da *Mangifera indica* que tem apresentado fortes evidências de possuir propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, além de estudos relacionados a efeitos antidiabéticos, antiHIV, anticâncer e antiapoptóticos. Baseados nesses estudos o objetivo desse trabalho foi investigar o possível efeito neuroprotetor da mangiferina no modelo de convulsão induzido pelo ácido caínico em peixe-zebra. A avaliação do efeito da mangiferina na dose de 20 mg/kg per se, foi realizada através da análise do comportamento do animal ao longo de uma hora e trinta minutos. A avaliação do perfil de crise epilética induzida por AC foi feita ao longo de uma hora após os trinta minutos de pré-tratamento com a mangiferina. Na avaliação comportamental dos efeitos da mangiferina, o grupo tratado não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle em nenhum dos parâmetros analisados. Já quando se analisou o perfil de crises epiléticas dos animais tratados com a mangiferina observou-se uma diminuição na intensidade das crises analisada pela área sob a curva. O tempo em que os animais permaneceram nos escores maiores de crises foi significativamente menor no grupo mangiferina, entretanto, quando foi avaliado o tempo de latência para a convulsão (escore 5-6) não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Portanto, baseado nos resultados encontrados pode-se sugerir que a mangiferina na dose testada apresentou respostas comportamentais que sugerem um efeito anticonvulsivante.

## ABSTRACT

Epilepsy is a disorder characterized by spontaneous seizures, characterized by abnormal neuronal discharges. Much of our understanding of this disorder occurred through studies in models of induction of seizures by chemical agents, such as models of kainic acid (KA), pilocarpine and pentylenetetrazol (PTZ). The use of rodent models for screening of new antiepileptic drugs increases the final cost of drugs development, therefore zebrafish has become an additional animal model to rodents due to the small space required for maintenance, rapid development and low cost per animal. The mangiferin is an active ingredient of Vimang®, an extract of *Mangifera indica* which has shown strong evidence of having antioxidant and anti-inflammatory properties, besides studies related to antidiabetic, anti-HIV, anticancer and antiapoptotic effects. Based on these studies, the aim of this study was to investigate the possible neuroprotective effect of mangiferin in the seizure model induced by kainic acid in zebrafish. To evaluate the effect of the mangiferin (20 mg/kg) itself been done by examining the behavior of the animal during one hour and thirty minutes. The evaluation of behavioral seizure scores induced by KA occurred during one hour after thirty minutes of pretreatment with mangiferin. In the evaluation the behavioral effects of mangiferin, the treated group showed no significant difference when compared to the control group in any of the parameters analyzed. However, when we analyzed the intensity of seizures in animals treated with mangiferin it was observed a decrease in seizure profile in the graph area under the curve. The time in which the animals remained in the higher seizure scores was significantly lower in the mangiferin group, but there was no statistically significant difference in the latency time to seizure (score 5-6) between groups. Therefore, our results suggested that mangiferin, at dose tested, shows behavioral responses indicating an anticonvulsant effect.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AC	ácido caínico
AMPA	ácido-amino- 3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico
DMSO	dimetilsulfóxido
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBS	tampão fosfato salino
PTZ	pentilenotetrazol
ROS	espécies reativas de oxigênio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>ÁCIDO CAÍNICO COMO MODELO DE INDUÇÃO DE CRISES EPILÉPTICAS</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2</b>	<b>PEIXE-ZEBRA COMO MODELO DE CRISES EPILÉPTICAS</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3</b>	<b>MANGIFERINA E NEUROPROTEÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>15</b>
	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>16</b>
	<b>RESUMO</b> .....	<b>17</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Considerações éticas (para pesquisas com animais)</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Reagentes</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Animais</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Tratamento com mangiferina</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b>Avaliação comportamental</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6</b>	<b>Modelo de indução de crises convulsivas</b> .....	<b>22</b>
<b>2.7</b>	<b>Escores de convulsão</b> .....	<b>22</b>
<b>2.8</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Avaliação comportamental</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Escores de Convulsão</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>25</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>26</b>

<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é um transtorno neurológico caracterizado pela ocorrência de crises epiléticas recorrentes e espontâneas, as quais resultam da atividade neuronal hipersincrônica, excessiva e anormal que afeta cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. Tal distúrbio é uma desordem neurológica comum causada pelo desequilíbrio de processos excitatórios e inibitórios. Em humanos os tipos de crises manifestam-se em várias síndromes epiléticas, com determinantes genéticos e ambientais (Bradford, 1995, Stewart *et al*, 2012). Mesmo com o tratamento adequado muitos pacientes continuam a ter crises, o que é chamado de epilepsia refratária.

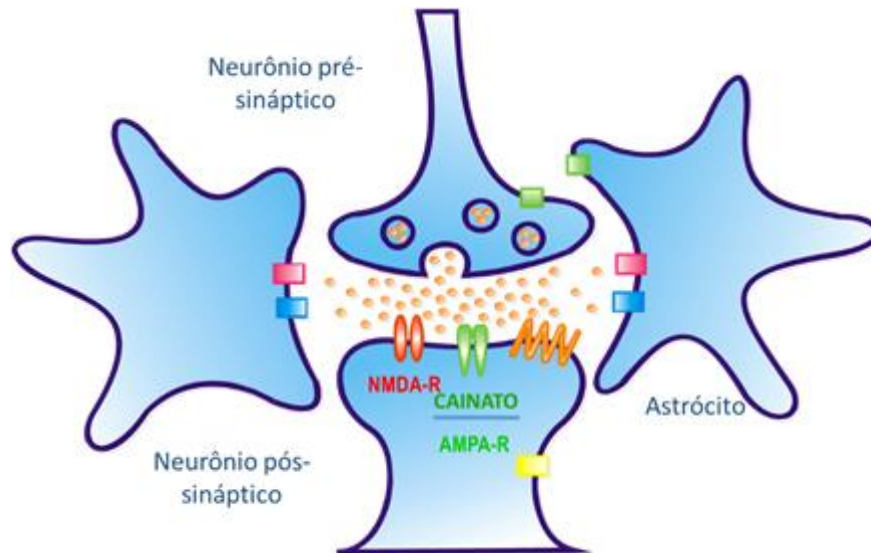
Essa descarga elétrica excessiva pode iniciar como uma descarga local anormal e se propagar para as demais áreas do cérebro. O local em que a descarga se inicia e o grau que sua propagação atinge determinam os sintomas que serão manifestados. Tais sintomas podem variar de um lapso de atenção à perda de consciência. Sendo assim, as epilepsias podem ser divididas em duas principais categorias: crises parciais e generalizadas. Na crise parcial a descarga é local e geralmente permanece localizada e pode estar associadas a lesões cerebrais focais, sendo que sua incidência aumenta com a idade. As crises generalizadas envolvem o cérebro inteiro e são caracterizadas pela perda de consciência. Estas são subdivididas em tônico-clônicas, clônicas, mioclônicas, atônicas, tônicas e crises de ausência (Rang & Dale, 2007, p.575).

Embora a causa exata do desencadeamento de crises epiléticas ainda não esteja clara, há evidências que suportam o papel do glutamato, um neurotransmissor excitatório, nestas crises. Dentre essas evidências estão os altos níveis de glutamato que são encontrados nos pacientes epiléticos assim como em modelos experimentais e a redução da liberação de glutamato por drogas antiepiléticas como a carbamazepina, fenitoína, lamotrigina e gabapentina (Kao-Chang Lin *et al*, 2013).

O glutamato é o principal transmissor excitatório do sistema nervoso central. Os receptores de glutamato são subdivididos em quatro subtipos, os receptores NMDA, AMPA, cainato e metabotrópicos, sendo os três primeiros receptores ionotrópicos (Rang & Dale, 2007, p.575) (Figura 1).

Até o momento, a grande maioria dos estudos acerca das epilepsias vem sendo realizados em roedores (Lothman *et al*, 1989, Mello *et al*, 1993, Lukasiuk *et al*, 2003) e/ou

em tecido humano obtido a partir de amostras cirúrgicas de pacientes portadores de epilepsia refratária (Prince *et al*, 1981, Schwartzkroin *et al*, 1984). Apesar de estudos mais recentes incorporarem abordagens com animais mutantes, grande parte de nosso conhecimento sobre epilepsias deriva de estudos em modelos de indução em roedores de crises por agentes químicos, tais como os modelos do AC, da pilocarpina e do PTZ.

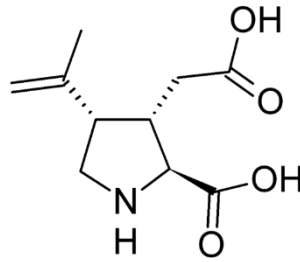


**Figura 1: Ilustração da liberação do glutamato na fenda sináptica.** O glutamato é liberado na fenda e atua sobre os receptores ionotrópicos NMDA, AMPA e cainato (representados na figura) e em receptores metabotrópicos. O AC atua como agonista dos receptores de cainato. (Adaptado de *Basic Neurochemistry, 7th Edition, 2006*)

## 1.1 ÁCIDO CAÍNICO COMO MODELO DE INDUÇÃO DE CRISES EPILÉPTICAS

O AC (Figura 2) é um análogo cíclico do L-glutamato e um agonista dos receptores ionotrópicos de cainato. Ele foi isolado e extraído no início de 1950, a partir de uma alga vermelha (*Digenea simplex*) encontradas em águas tropicais e subtropicais (Lévesquea *et al*, 2013, Murakami *et al*, 1953). Apesar de ele ter sido utilizado com outra finalidade inicialmente, posteriormente observou-se que o AC induziu respostas excitatórias prolongadas nos neurônios corticais após serem submetidos à microiontoforese, então se evidenciou que ele pode induzir despolarizações intensas e, eventualmente, morte celular, fenômeno observado na epilepsia do lobo temporal (Lévesquea *et al*, 2013). Portanto, têm sido proposto que crises epiléticas induzidas pelo AC e morte neuronal estão ligadas à liberação patológica do glutamato. Então, baseado em semelhanças comportamentais e patológicas, o AC tem sido

amplamente utilizado experimentalmente como indutor de modelo de epilepsia do lobo temporal, o tipo mais comum de epilepsia refratária (Kao-Chang Lin *et al*, 2013).



**Figura 2: Representação da fórmula estrutural do AC**

Na experimentação animal o AC pode ser utilizado pela administração sistêmica, o que tem como vantagem em relação à via de administração por injeção intracerebral a possibilidade de tratar mais de um animal ao mesmo tempo, além de não necessitar de procedimentos cirúrgicos (Lévesquea *et al*, 2013). Entretanto, uma das razões que limita o sucesso em se descobrir novas estratégias para prevenir o desenvolvimento da epilepsia e da farmacoresistência se dá parcialmente pela falta de animais de experimentação que se aproximem das características da epilepsia em humanos, assim como o menor entendimento da fisiopatologia da farmacoresistência e epileptogênese (Stables *et al*, 2002).

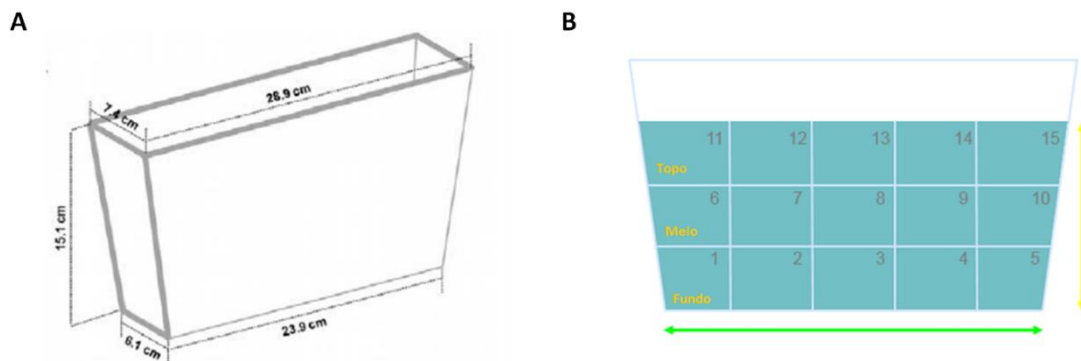
## 1.2 PEIXE-ZEBRA COMO MODELO DE CRISES EPILÉPTICAS

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo (3 a 4 cm) de água doce pertencente à família Cyprinidae. Tem sua origem no sul da Ásia, principalmente dos rios e córregos da Índia, Nepal, Bangladesh, Myanmar e Paquistão (Spence *et al*, 2008). Durante anos, foi amplamente utilizado como peixe ornamental e, a partir da década de 80, através dos trabalhos desenvolvidos por George Streisinger e seu grupo de pesquisa no Caltech (Pasadena, CA, USA), passou a ser também utilizado como modelo em estudos genéticos e de biologia do desenvolvimento. Atualmente, tornou-se um modelo experimental consolidado em diversas áreas do conhecimento, tais como, genética e genômica, teratologia e toxicologia (Vascotto, *et al*, 1997).

Em relação aos modelos em mamíferos, inúmeros fatores favoreceram o uso do peixe-zebra como modelo para diversos estudos, tais como: pequeno espaço requerido para

manutenção, baixo custo por animal, rápido desenvolvimento e ciclo biológico, grande prole, embriões translúcidos e, principalmente, susceptibilidade à manipulação genética (Lele *et al*, 1996).

O peixe-zebra tornou-se um modelo animal utilizado em estudos comportamentais na área de neurociência (Gerlai *et al*, 2006, Blaser *et al*, 2006, Rosemberg *et al*, 2011). Semelhante ao teste de *open field* usado para roedores, o teste de *novel tank*, também conhecido como *open tank* (Figura 3), tem sido usado para a avaliação comportamental desse modelo animal. Esse teste visa avaliar a atividade exploratória vertical, que consiste na tendência do animal inicialmente mergulhar até o fundo e gradualmente explorar as áreas superiores do aquário (Rosemberg *et al*, 2011)

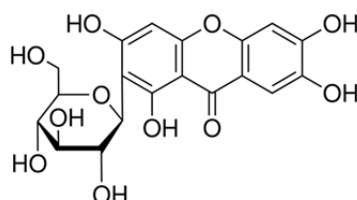


**Figura 3: Ilustração do aparato.** O aparato consiste em um aquário de plástico em forma de trapézio com as dimensões representadas na figura (A). O aparato é virtualmente dividido horizontalmente em três áreas: topo, meio e fundo. Cada área é dividida verticalmente em cinco, totalizando 15 áreas (B).

Pelo fato de combinar a relevância de um vertebrado na escala de um invertebrado (Goldsmith, 2004), o peixe-zebra está se tornando um modelo animal complementar aos roedores principalmente para estudos translacionais em larga escala, o que favorece a descoberta de novos mecanismos envolvidos em diferentes aspectos fisiopatológicos relacionados à injúria cerebral, bem como na busca de estratégias terapêuticas inovadoras (Barbazuk *et al*, 2000, Ebarasi *et al*, 2011, Gerlai *et al*, 2000, Lieschke *et al*, 2007). Em abordagens envolvendo convulsão e sistema glutamatérgico, pela primeira vez foi descrito o perfil comportamental de crises convulsivas frente à administração de AC, similar ao de roedores (Alfaro *et al*, 2011). Além disso, já foi mostrado para esta espécie o padrão de expressão das subunidades dos receptores cainato em neurônios da retina e suas respostas fisiológicas ao glutamato (Nelson *et al*, 2001).

### 1.3 MANGIFERINA E NEUROPROTEÇÃO

A Mangiferina (Figura 4) é uma xantona abundantemente encontrada em frutas e córtex de caule da *Mangifera indica* L (Manga). Ela é o principal ingrediente que compõe o Vimang®, um extrato de *Mangifera indica* originário de Cuba (Ibarretxe *et al*, 2006) que pode ser encontrado tanto na forma de xarope como de creme para uso tópico. Esta molécula vem sendo estudada apresentando propriedades antioxidantes e antiapoptóticas, oferecendo suporte para aplicações em triagens clínicas envolvendo patologias relacionadas à excitotoxicidade e morte neuronal (Campos-Esparza *et al*, 2009). Essa excitotoxicidade ocorre quando há alta concentração de glutamato na fenda sináptica, o que resulta na superestimulação de seus receptores e entrada excessiva de  $\text{Ca}^{2+}$  no terminal pós-sináptico, esse processo somado à liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas intracelulares, elevam a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  ativando os mecanismos intracelulares de excitotoxicidade que culminam na morte neuronal (Sattler *et al*, 2000). Neste contexto, muitos mecanismos foram investigados no qual este polifenol se mostrou capaz de reduzir a formação de ROS, ativar enzimas antioxidantes e restaurar o potencial de membrana mitocondrial.



**Figura 4: Representação da fórmula estrutural da mangiferina.** Polifenol extraído da fruta e córtex do caule da *Mangifera indica* L.

Uma vez bem documentadas as evidências a respeito das propriedades antioxidantes, a mangiferina tem sido estudada com relação a diversas atividades farmacológicas incluindo antidiabética, antiHIV, anticâncer e anti-inflamatória (Garrido *et al*, 2004, Guha *et al*, 1996, Ichiki *et al*, 1998, Yoshimi *et al*, 2001, Leiro *et al*, 2004). A investigação em modelo experimental de cultura de células para estudo de excitotoxicidade glutamatérgica promovido por processo isquêmico também vem sendo realizada. A morte celular causada pelo glutamato em cultura de células neuronais foi diminuída na presença de baixas concentrações desse polifenol na qual atenuaram o influxo de cálcio estresse oxidativo, bem como apoptose. Além disso, a mangiferina foi capaz de diminuir radicais livres e perda neuronal na região CA1 de hipocampo de ratos submetidos ao modelo de insulto de isquemia global (Leiro *et al*, 2004).

Desta forma, considerando as evidências que indicam a mangiferina como uma importante molécula com atividade neuroprotetora, é relevante que se busque novos estudos terapêuticos relacionados ao tratamento de danos e disfunções no sistema nervoso central, inclusive eventos epiléticos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Sendo o peixe-zebra um vertebrado suscetível a diferentes substâncias indutoras de crises epiléticas, como o AC, o presente projeto visa à utilização deste modelo já consolidado em nosso laboratório para avaliar os possíveis efeitos neuroprotetores promovidos pela mangiferina na indução de crises epiléticas.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o efeito da mangiferina na dose de 20 mg/kg no perfil comportamental do peixe-zebra.

Investigar o efeito do pré-tratamento (30min) da mangiferina na dose de 20 mg/kg no perfil da crise epilética dos animais injetados com AC.

## **ARTIGO CIENTÍFICO**

O artigo intitulado “Avaliação do Potencial Efeito Protetor da Mangiferina no Modelo de Crise Epiléptica Induzido Pelo Ácido Caínico em Peixe-Zebra Adulto” foi formatado conforme normas para publicação junto ao periódico *Seizure: the Journal of the British Epilepsy Association*.



## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO PROTETOR DA MANGIFERINA NO MODELO DE CRISE EPILÉPTICA INDUZIDO PELO ÁCIDO CAÍNICO EM PEIXE-ZEBRA ADULTO**

Lauryn da Silva Barreto, Ben Hur Mussulini, Luana Moro, Suelen Baggio, Eduardo Pacheco Rico, Diogo Losch de Oliveira\*.

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

(\*) Correspondência:

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo. Bairro Santa Cecília, Porto Alegre – RS, Brasil

CEP: 90035-003

Fone 51 3308 5556

E-mail: diogolosch@gmail.com

### **RESUMO**

A epilepsia é um distúrbio que se caracteriza por crises epiléticas espontâneas, caracterizadas por descargas neuronais anormais. O uso dos modelos em roedores para *screening* de novas substâncias antiepiléticas eleva o custo final de desenvolvimento de fármacos, assim o peixe-zebra tornou-se um modelo animal complementar aos roedores, devido a vantagens como o pequeno espaço requerido para manutenção e baixo custo por animal. A mangiferina é um ingrediente ativo do Vimang<sup>®</sup>, um extrato da *Mangifera indica* que tem apresentado fortes indícios de possuir propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Baseados nesses estudos o objetivo desse trabalho foi investigar o possível efeito neuroprotetor da mangiferina no modelo de crises epiléticas induzido pelo ácido caínico em peixe-zebra. A dose utilizada foi 20 mg/kg, e seu efeito per se foi feito através da análise do comportamento do animal. A avaliação do perfil de crises induzidas por AC foi feita ao longo de uma hora após o pré-tratamento com a mangiferina. Na avaliação comportamental dos efeitos da mangiferina o grupo tratado não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Já quando se analisou o perfil de crises dos animais tratados com a mangiferina observou-se uma diminuição no neste perfil analisada pela área sob a curva. O tempo em que os animais

permaneceram nos maiores escores de crises foi significativamente menor no grupo mangiferina, entretanto no tempo de latência para a convulsão (escore 5-6) não houve diferença significativa entre os grupos. Portanto, baseado nos resultados encontrados pode-se sugerir que a mangiferina na dose testada possui efeitos anticonvulsivantes.

Palavras-chave: Ácido caínico; Epilepsia; Mangiferina; Peixe-zebra.

## 1 INTRODUÇÃO

As epilepsias são transtornos neurológicos caracterizados pela ocorrência de crises epiléticas espontâneas, as quais resultam da atividade neuronal hipersincrônica, excessiva e anormal. Atualmente cerca de 50 milhões de pessoas sofrem de epilepsia no mundo, sendo que a maioria encontra-se em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Até o momento, a grande maioria dos estudos acerca das epilepsias vem sendo realizados em roedores<sup>1, 2, 3</sup> e/ou em tecido humano obtido a partir de amostras cirúrgicas de pacientes que sofrem de epilepsia refratária.<sup>4, 5</sup> Apesar de trabalhos mais recentes incorporarem abordagens com animais mutantes, grande parte de nosso conhecimento sobre epilepsias deriva de estudos em modelos de indução de crises por agentes químicos, tais como os modelos do ácido caínico (AC), da pilocarpina e do pentilenotetrazol (PTZ). Dentre as diversas contribuições que estes modelos proporcionaram, podemos destacar a identificação de alterações na expressão de receptores ionotrópicos,<sup>6</sup> morte neuronal induzida por crises epiléticas prolongadas,<sup>7</sup> neurogênese hipocampal e plasticidade sináptica.<sup>8</sup> Além disso, também tornaram-se importantes instrumentos no descobrimento e desenvolvimento pré-clínico de drogas antiepiléticas.<sup>9</sup> No entanto, o uso dos modelos em roedores para *screening* de novas substâncias anticonvulsivas eleva o custo final de desenvolvimento de fármacos, visto que é necessário um elevado número de animais para realização dos testes bem como um alto custo para sua criação e manutenção.

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo (3 a 4 cm) de água doce pertencente à família Cyprinidae. Tem sua origem no sul da Ásia.<sup>10</sup> A partir da década de 80, através dos trabalhos desenvolvidos por George Streisinger e seu grupo de pesquisa no Caltech (Pasadena, CA, USA), passou a ser utilizado como modelo experimental em estudos genéticos e de biologia do desenvolvimento. Atualmente, tornou-se um modelo experimental consolidado em diversas áreas do conhecimento, tais como, genética e genômica, teratologia e toxicologia.<sup>11</sup> Em relação aos modelos em mamíferos, inúmeros fatores favoreceram o uso do

peixe-zebra como modelo experimental, tais como: pequeno espaço requerido para manutenção, baixo custo por animal, rápido desenvolvimento e ciclo biológico, grande prole, embriões translúcidos e, principalmente, susceptibilidade à manipulação genética.<sup>12</sup> Além disso, em 2001 o Instituto Sanger iniciou o sequenciamento do genoma total, observando uma homologia de aproximadamente 70-80% com o genoma humano.<sup>13</sup>

Pelo fato de combinar a relevância de um vertebrado na escala de um invertebrado<sup>15</sup>, o peixe-zebra vem se tornando um modelo animal complementar aos roedores principalmente para estudos translacionais em larga escala, o que favorece a descoberta de novos mecanismos envolvidos em diferentes aspectos fisiopatológicos relacionados à lesão cerebral, bem como na busca de estratégias terapêuticas inovadoras.<sup>14, 15, 16, 17, 18</sup>

A mangiferina é uma xantona abundantemente encontrada em frutas e córtex de caule da *Mangifera indica* L (Manga).<sup>19</sup> Esta molécula vem sendo estudada apresentando propriedades antioxidantes e antiapoptóticas, oferecendo suporte para aplicações em triagens clínicas envolvendo patologias relacionadas à excitotoxicidade e morte neuronal.<sup>20</sup> Neste contexto muitos mecanismos foram investigados no qual este polifenol se mostrou capaz de reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativar enzimas antioxidantes e restaurar o potencial de membrana mitocondrial.<sup>20</sup> Uma vez bem evidenciadas as propriedades antioxidantes, a mangiferina tem sido bem documentada em diversas atividades farmacológicas incluindo antidiabética, antiHIV, anticâncer e anti-inflamatória.<sup>21, 22, 23, 24, 25</sup> A investigação em modelo experimental para estudo de excitotoxicidade glutamatérgica promovido por processo isquêmico também vem sendo realizada. A morte celular causada pelo glutamato em cultura de células neuronais foi diminuída na presença de baixas concentrações de mangiferina na qual atenuaram o influxo de cálcio, estresse oxidativo, bem como apoptose. Além disso, a mangiferina foi capaz de diminuir radicais livres e perda neuronal na região CA1 de hipocampo de ratos submetidos ao modelo de insulto de isquemia global.<sup>26</sup> Desta forma, todas estas evidências indicam a mangiferina como uma importante molécula com atividade neuroprotetora na qual pode apresentar um importante valor terapêutico para o tratamento de danos e disfunções no sistema nervoso central. Sabendo que muitos fármacos neuroprotetores têm ação anticonvulsivante, esse estudo tem como objetivo avaliar o potencial anticonvulsivante da mangiferina em modelo de indução por AC em peixe-zebra.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Considerações éticas (para pesquisas com animais)

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (n° 24471) e estão em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

### 2.2 Reagentes

Ácido cáínico (AC) foi adquirido da Tocris Bioscience<sup>®</sup>. Mangiferina e o Dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

### 2.3 Animais

Foram utilizados peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos (com aproximadamente 4-7 meses de idade) do sexo masculino da linhagem heterogênea do fenótipo short-fin (SF), pesando em média  $0,35\text{g} \pm 0,02$ . Os animais foram obtidos de fornecedores especializados (Delphis, RS) e mantidos no ZebTEC<sup>®</sup> (Tecniplast) com temperatura ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), pH (7,2) e condutividade ( $500 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ ) controlados, e aclimatados por duas semanas no biotério da universidade em condições otimizadas de manutenção. Foram utilizados 39 animais no total, 24 para a avaliação comportamental e 15 para o modelo de indução de crises convulsivas.

### 2.4 Tratamento com mangiferina

A investigação do potencial efeito neuroprotetor da mangiferina (1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone-C2-beta-D-glucosideo) foi realizada através da exposição por injeção intraperitoneal do polifenol. Os peixes adultos foram anestesiados por imersão em  $160 \mu\text{g}/\text{mL}$  de triclaína e após injetados intraperitonealmente (i.p.) com mangiferina. Previamente o

polifenol foi diluído (DMSO 50% como veículo) e injetado um volume de 7  $\mu$ L em uma concentração de 20 mg/kg utilizando como referência estudos prévios.<sup>26</sup> Foram feitos dois experimentos, o primeiro para avaliar se a mangiferina causaria algum efeito per se, então os animais foram submetidos ao pré-tratamento com mangiferina e após 30 min foram novamente injetados com PBS e seu comportamento monitorado. Para essa avaliação comportamental foram utilizados 24 animais, divididos em três grupos de 8 denominados grupo controle, grupo controle-DMSO e grupo mangiferina. Os animais foram injetados conforme a Figura 1.

Já os demais animais, após o pré-tratamento com mangiferina, foram induzidos aos modelos de crises epiléticas que serão descritos.

## 2.5 Avaliação comportamental

A fim de se analisar os efeitos da mangiferina per se foi realizada uma avaliação da locomoção do animal através do teste de “*open tank*”. Nesse teste o animal é colocado em um aparato de plástico transparente em forma de trapézio contendo 1,5 litros de água. As dimensões são semelhantes as já descritas previamente.<sup>27, 28</sup> Foi utilizada uma webcam (Logitech<sup>®</sup> HD Pro Webcam C920) para filmar os animais no período de uma hora e trinta minutos. A fim de manter o fundo homogêneo para a análise, foram colocadas folhas de papel amarelo atrás do aparato, e para aumentar o contraste do animal em relação ao fundo foram colocadas duas lâmpadas atrás da folha.

Para a análise exploratória vertical o aparato foi virtualmente dividido horizontalmente em três áreas: topo, meio e fundo; e cada área foi dividida em cinco seções para a análise exploratória horizontal do peixe-zebra.

A análise comportamental foi realizada em um computador portátil utilizando o *software* ANY-maze<sup>®</sup> (Stoelting CO, USA). Os parâmetros de exploração analisados foram a distância percorrida, velocidade média, ângulo de giro absoluto (que representa as variações na direção do animal), tempo imóvel e o tempo gasto no topo e no fundo.

## 2.6 Modelo de indução de crises epiléticas

Neste trabalho, foi utilizado o modelo do AC. As soluções foram diluídas em tampão fosfato PBS, pH 7.2 para o tratamento que foi previamente descrito.<sup>29</sup> Trinta minutos após a injeção de mangiferina, os animais adultos foram novamente anestesiados por imersão em 160µg/mL de tricafina e injetados com AC na concentração de 5 mg/kg. Foram utilizados 15 animais também divididos em três grupos: grupo controle, grupo controle-DMSO e grupo mangiferina. Os animais foram injetados conforme a Figura 2.

## 2.7 Escores de crises epiléticas

Os peixes-zebra foram colocados individualmente em aparatos retangulares medindo 9,5cm ×10cm ×10cm. Para determinar o score de convulsão os animais foram monitorados durante uma hora utilizando-se uma webcam (Logitech® HD Pro Webcam C920). Os scores foram quantificados conforme a escala abaixo (Tabela 1):<sup>29</sup>

Os escores de crises epiléticas medidos ao longo de uma hora foram analisados em intervalos de 30 em 30 segundos até o minuto 20, em que foi registrado o maior score nesses intervalos de tempo. A partir desse minuto a análise foi realizada considerando o maior score no intervalo de um minuto até o minuto 45, após dividimos o tempo restante em intervalos de 2,5 minutos.

As análises dos escores das crises epiléticas foram feitas por 3 observadores independentes (teste cegos) treinados.

## 2.8 Análise Estatística

Os parâmetros de avaliação comportamental foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni e ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Os escores de crises epiléticas que os animais atingiram foram medido como mediana e intervalo interquartil. A latência para atingir a convulsão (escore 5-6) foi analisada usando ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni. As análises foram realizadas utilizando-se o *software Graph Pad Prism 6*.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação comportamental

A análise comportamental mostrou uma diminuição estatisticamente significativa na locomoção do grupo DMSO nos parâmetros de distância percorrida (ANOVA de uma via,  $p < 0,05$ ,  $F = 5,58$ ) nos primeiros 30 minutos de teste em relação ao grupo controle, entretanto em relação ao grupo mangiferina não houve diferença significativa, assim como o grupo controle em relação ao grupo mangiferina (Figura 3A). No número de cruzamentos (ANOVA de uma via,  $p < 0,05$ ,  $F = 4,203$ ) e na velocidade média (ANOVA de uma via,  $p < 0,05$ ,  $F = 5,54$ ) os grupos seguiram o mesmo padrão (Figura 3A), ou seja, houve diminuição significativa do grupo DMSO em relação ao grupo controle, e as demais comparações não apresentaram diferença significativa. Por outro lado, nos 60 minutos seguintes não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum parâmetro analisado (Figura 3B). A análise do tempo imóvel foi realizada ao decorrer do tempo de teste analisando-se intervalos de um minuto (ANOVA de duas vias). Apenas no intervalo da primeira meia hora houve diferença estatisticamente significativa no tempo do grupo DMSO em relação ao controle, já entre os grupos mangiferina e controle não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 3C; 3D).

O tempo gasto pelo grupo nas diferentes áreas (topo, meio e fundo) durante uma hora no *open tank* foi representado pelo *occupancy plot* (Figura 4). E também não houve diferença significativa entre eles (ANOVA de uma via,  $p < 0,05$ ).

#### 3.2 Escores de Crises Epilépticas

Na análise dos escores que cada grupo atingiu durante uma hora, os grupos controle e DMSO mostraram-se semelhantes, ao passo que os animais do grupo mangiferina atingiram escores menores ao longo de quase todo o tempo de teste (Figura 5A). Nos intervalos de tempo iniciais não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, o que é mostrado no gráfico de área sob a curva no intervalo de 0 a 8 minutos (ANOVA de uma via,  $p < 0,05$ ) e no gráfico de latência para convulsão (escore 5-6) (Figura 5D).

Já no intervalo de 8 a 15 minutos houve uma diminuição significativa na área sob a curva do grupo mangiferina quando comparado com os demais grupos (ANOVA de uma via,  $p < 0,05$ ). Nos intervalos de 15 a 30 minutos, 30 a 45 minutos e 45 a 60 minutos (ANOVA de uma via,  $p < 0,05$ ) também houve diferença significativa do grupo mangiferina em relação ao grupo controle e DMSO, e da mesma forma que nos demais intervalos, não houve diferença significativa entre estes últimos grupos (Figura 5B).

O gráfico de tempo em que os animais permaneceram em escore 5 e 6 (ANOVA de uma via,  $p < 0,05$ ) mostra que houve diminuição significativa entre os animais do grupo pré-tratados com mangiferina em relação ao grupo DMSO e controle (Figura 5C). Já o tempo em que os grupos DMSO e controle permaneceram em escore 5 e 6 não apresentou diferença significativa entre eles.

#### **4 DISCUSSÃO**

Neste trabalho avaliamos o potencial efeito anticonvulsivo da mangiferina em modelo de ácido cáinico. Para avaliar se a mangiferina causaria efeitos per se no peixe-zebra, foi analisada a locomoção dos animais ao decorrer de uma hora e trinta minutos. Durante os primeiros 30 minutos e os 60 minutos subsequentes o grupo mangiferina não apresentou diferença estatisticamente significativa ao grupo controle e ao grupo DMSO em nenhum dos parâmetros analisados. Esses dados mostram que a mangiferina per se não causa efeitos no comportamento do animal o que demonstra que o perfil de crise não foi influenciado por algum possível efeito desse polifenol.

Conforme já descrito anteriormente, observamos os mesmos escores de crises em peixe-zebra<sup>29</sup> ao longo de uma hora após o tratamento com 20mg/kg de mangiferina. O resultado mostra que houve uma diminuição no perfil de crises a partir do oitavo minuto aproximadamente nos animais submetidos ao pré-tratamento com a mangiferina. No gráfico (Figura 5A) pode-se observar que a linha que representa o grupo tratado permanece mais próxima do eixo x ao longo dos primeiros trinta minutos, o que representa que os animais atingiram escores menores que os animais controle. Nos minutos restantes o grupo mangiferina ainda se manteve em escores mais baixos.



A análise de intensidade de crises medida pela área sob curva mais uma vez evidencia o possível efeito anticonvulsivante dessa molécula. No intervalo de 8-15min há uma acentuada diferença entre os grupos, em que o grupo mangiferina apresenta níveis menores de crises. Da mesma forma, esse grupo apresenta diminuição significativa nos intervalos subsequentes (Figura 5B).

O tempo que os animais permaneceram nos estágios 5 e 6, que representam o fenótipo clássico de convulsão, também foram analisados. Esses resultados também demonstram que os animais tratados permaneceram um tempo significativamente menor nos escores mais altos de crises. Estudos já correlacionam esses estágios com o *status epilepticus* (definido como crises ininterruptas contínuas durando mais de 30 min)<sup>30</sup>, portanto, a mangiferina mostrou-se capaz de diminuir o tempo em que os animais permaneceram nesse estado. O tempo de latência para convulsão (escore 5-6) entre os grupos não é estatisticamente significativo, resultado que já foi observado em outros estudos de indução de convulsão em peixe-zebra,<sup>31</sup> provavelmente pelo fato de o animal ainda estar sob efeito da anestesia nos primeiros minutos e pela diferença de recuperação entre os animais.

## 5 CONCLUSÃO

Baseados nos resultados do perfil, intensidade de crises epiléticas e tempo em escores 5 e 6, esse trabalho mostrou que a mangiferina na dose de 20 mg/kg possui um potencial efeito anticonvulsivante em peixe-zebra submetidos ao modelo de convulsão por AC. Juntos, esses resultados indicam que a mangiferina, do ponto de vista da análise dos escores comportamentais, possui um possível efeito anticonvulsivante, contudo são necessários outros estudos para corroborar suas evidências protetoras frente a indução de convulsão e para elucidar os mecanismos de ação dessa molécula.

## REFERÊNCIAS

1. Lothman, E.W., Bertram, E.H., Bekenstein, J.W., Perlin, J.B. Self-sustaining limbic status epilepticus induced by 'continuous' hippocampal stimulation: electrographic and behavioral characteristics. *Epilepsy Research*. Mar-Apr;3(2):107-19, 1989.
2. Lukasiuk, K., Kontula, L., Pitkänen, A. cDNA profiling of epileptogenesis in the rat brain. *The European Journal of Neuroscience*. Jan;17(2):271-9, 2003.
3. Mello, L.E., Cavaleiro, E.A., Tan, A.M., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Babb, T.L., Finch D.M. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*. Nov-Dec;34(6):985-95., 1993.
4. Prince, D.A., Wong, R.K. Human epileptic neurons studied in vitro. *Brain Research*. Apr 6;210(1-2):323-33, 1981.
5. Schwartzkroin, P.A., Knowles, W.D. Intracellular study of human epileptic cortex: in vitro maintenance of epileptiform activity? *Science*. Feb 17;223(4637):709-12, 1984.
6. Brooks-Kayal, A.R., Shumate, M.D., Jin H., Rikhter T.Y., Coulter, D.A. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nature Medicine*. Oct;4(10):1166-72., 1998.
7. de Oliveira, D.L., Fischer, A., Jorge, R.S., da Silva, M.C., Leite, M., Gonçalves, C.A., Quillfeldt, J.A., Souza, D.O., e Souza, T.M., Wofchuk, S. Effects of early-life LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus on memory and anxiety in adult rats are associated with mossy fiber sprouting and elevated CSF S100B protein. *Epilepsia*. May;49(5):842-52, 2008.
8. Khalilov, I., Holmes, G.L., Ben-Ari, Y. In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nature Neuroscience*. Oct;6(10):1079-85. Epub 2003 Sep 21., 2003 .
9. Löscher, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*. Jun;20(5):359-68. doi: 10.1016/j.seizure.2011.01.003. Epub 2011 Feb 2., 2011 .

10. Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. Feb;83(1):13-34, 2008.
11. Vascotto, S.G., Beckham, Y., Kelly, G.M. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochemistry and cell biology*. 75(5):479-85, 1997.
12. Lele, Z., Krone, P.H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology advances*. 14(1):57-72., 1996.
13. Stern, H.M., Zon, L.I. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nature reviews. Cancer*. Jul;3(7):533-9, 2003.
14. Barbazuk, W.B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Bedell, J.A., McPherson, J.D., Johnson, S.L. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome research*. Sep;10(9):1351-8, 2000 .
15. Goldsmith, P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology*. Oct;4(5):504-12, 2004 .
16. Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. Dec;67(4):773-82, 2000 .
17. Lieschke, G.J., Currie, P.D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature reviews. Genetics*. May;8(5):353-67, 2007.
18. Ebarasi, L., Oddsson, A., Hultenby, K., Betsholtz, C., Tryggvason, K. Zebrafish: a model system for the study of vertebrate renal development, function, and pathophysiology. *Current opinion in nephrology and hypertension*. Jul;20(4):416-24, 2011 .
19. Núñez Sellés, A.J., Vélez Castro, H.T., Agüero-Agüero, J., González-González, J., Naddeo, F., De Simone, F., Rastrelli, L. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. *Journal of agricultural and food chemistry*. Feb 13;50(4):762-6., 2002.
20. Campos-Esparza, M.R., Sánchez-Gómez, M.V., Matute, C. Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. *Cell Calcium*. Apr;45(4):358-68, 2009.

21. Ichiki, H., Miura, T., Kubo, M., Ishihara, E., Komatsu, Y., Tanigawa, K., Okada, M. New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. *Biological & pharmaceutical bulletin*. Dec;21(12):1389-90, 1998.
22. Guha, S., Ghosal, S., Chattopadhyay, U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy*. Nov-Dec;42(6):443-51, 1996.
23. Yoshimi, N., Matsunaga, K., Katayama, M., Yamada, Y., Kuno, T., Qiao, Z., Hara, A., Yamahara, J., Mori, H. The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats. *Cancer Letters*. Feb 26;163(2):163-70, 2001.
24. Leiro, J., Arranz, J.A., Yáñez, M., Ubeira, F.M., Sanmartín, M.L., Orallo, F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *International immunopharmacology*. Jun;4(6):763-78, 2004.
25. Garrido, G., González, D., Lemus, Y., García, D., Lodeiro, L., Quintero, G., Delporte, C., Núñez-Sellés, A.J., Delgado, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. Aug;50(2):143-9, 2004.
26. Gottlieb, M., Leal-Campanario, R., Campos-Esparza, M.R., Sánchez-Gómez MV, Alberdi E, Arranz A, Delgado-García JM, Gruart A, Matute C. Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiology of disease*. Aug;23(2):374-86, 2006.
27. Levin, D. E., Bencan, Z., Cerutti, D.T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology & Behavior*. Vol.90, 54–58, 2007.
28. 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. Differences in Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish in the Open Tank Paradigm after a Short-Period Confinement into Dark and Bright Environments. *PLoS One*. 2011.
29. Alfaro, J.M., Ripoll-Gómez, J. and Burgos, J.S. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures. *European Journal of Neuroscience*. Vols. 33, 1252–1255. 2011.

30. Sierra, S., Alfaro, J.M., Sánchez, S., Burgos, J.S. Administration of docosahexaenoic acid before birth and until aging decreases. *Brain Research Bulletin*. 467– 470, 2012.
31. 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. Seizures induced by pentylentetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. *PLoS One*. 8(1): e54515. 2013.

**Figura 1: Representação esquemática do protocolo experimental no *Open Tank*.** A metodologia foi utilizada para avaliar os efeitos da mangiferina per se no perfil locomotor dos animais.

**Figura 2: Representação esquemática do protocolo experimental da avaliação experimental no perfil de crises epiléticas.** A metodologia foi utilizada para avaliar o perfil de crises induzidas pelo ácido cáfnico.

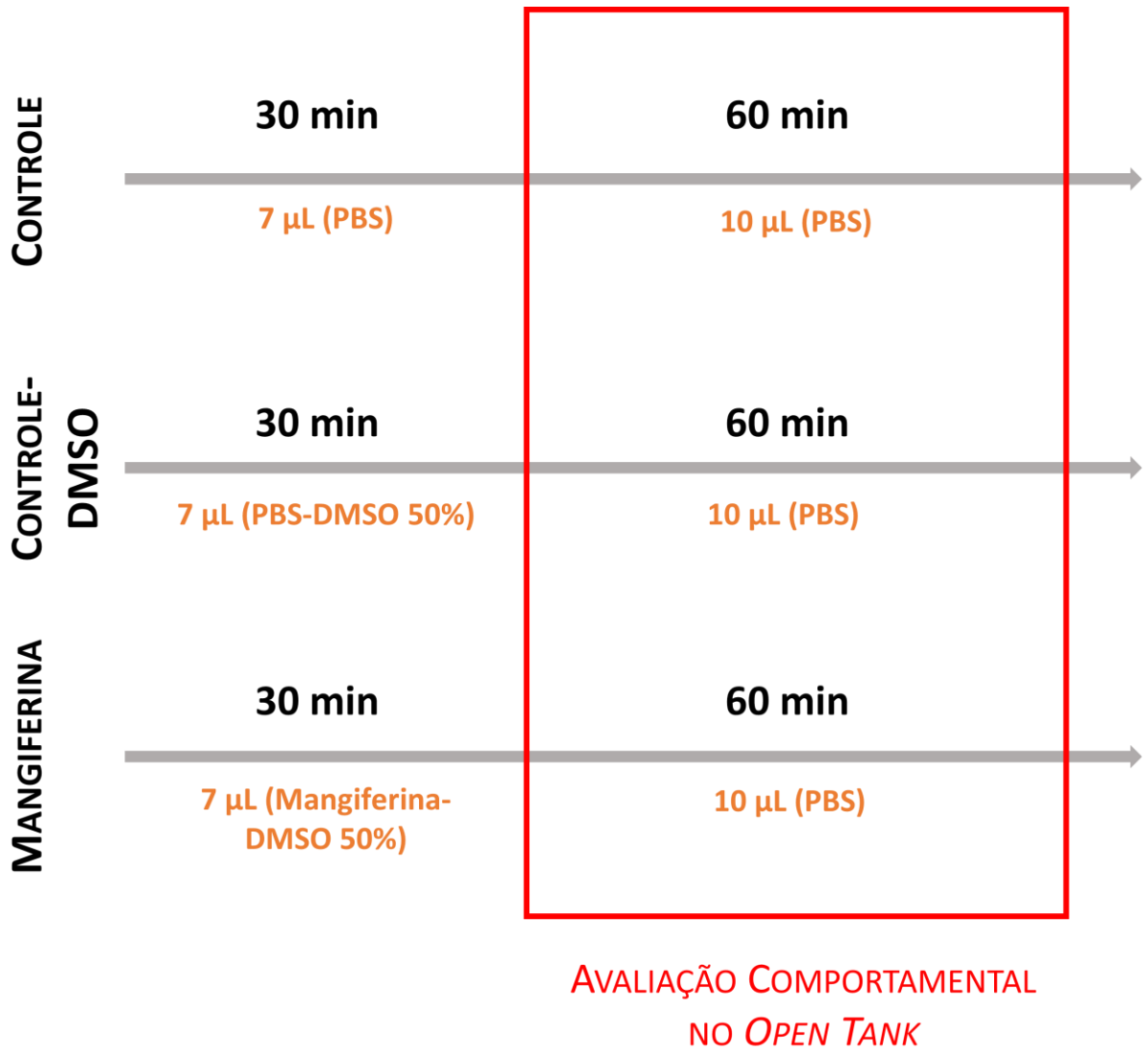
**Tabela 1:** Classificação dos escores de crises epilépticas induzidas por AC em peixes-zebra adultos.

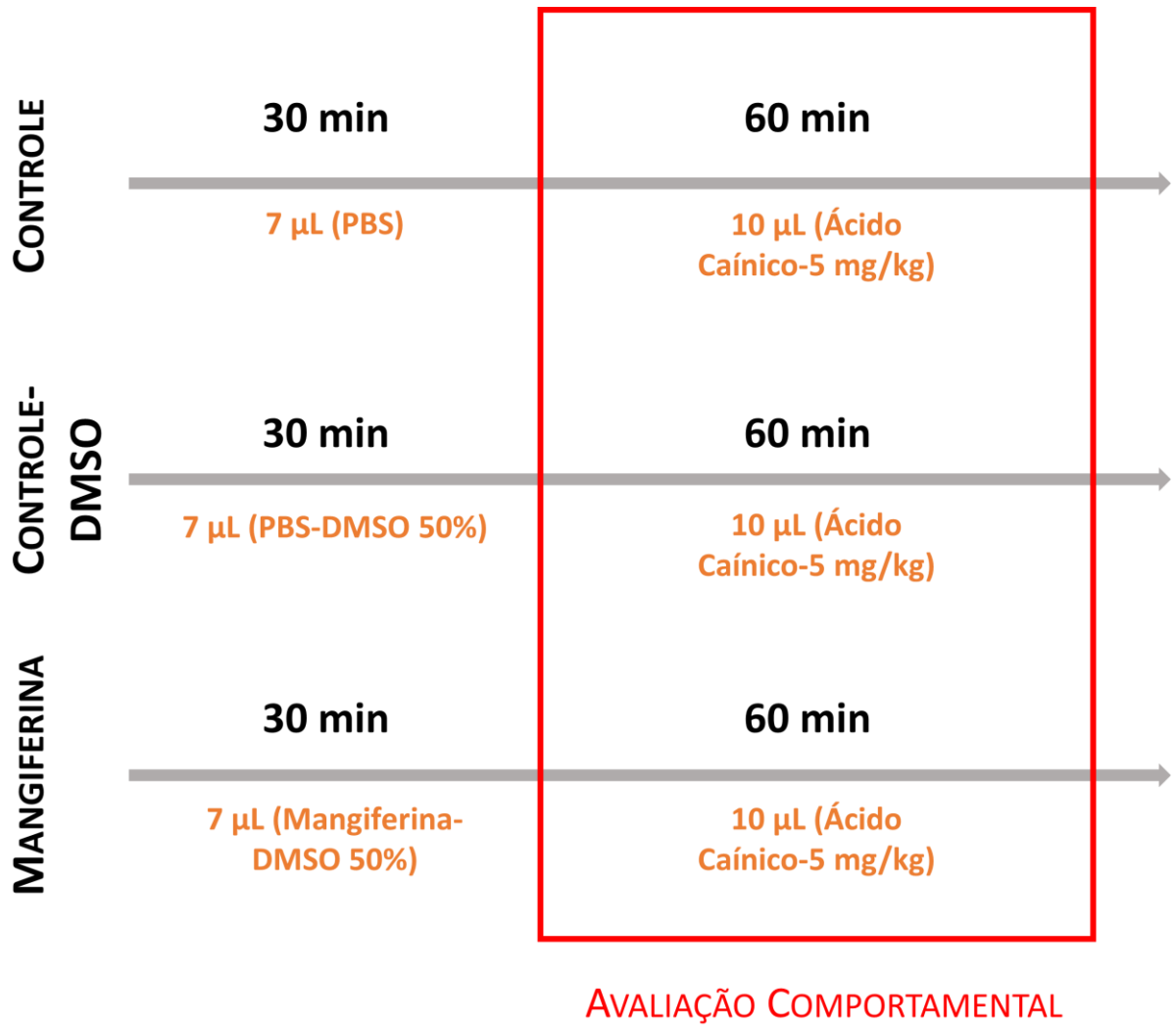


**Figura 3: Avaliação comportamental dos efeitos per se da mangiferina na dose de 20 mg/kg.** Os parâmetros de distância percorrida, número de cruzamentos e velocidade média ao decorrer de 30 minutos (A) e ao decorrer dos 60 minutos posteriores (B). A análise foi feita utilizando a ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni,  $*=p<0,05$ ,  $n=8$ ; O tempo imóvel foi analisado ao decorrer de 30 minutos (C) e ao decorrer dos 60 minutos posteriores (D). A análise foi feita utilizando a ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni,  $*=p<0,05$ ,  $n=8$ .

**Figura 4: Representação do *occupancy plot* mostrando o tempo de permanência em cada área do *open tank*.** Cada figura representa um grupo: controle (A), DMSO (B) e mangiferina (C).

**Figura 5: Avaliação do efeito da mangiferina no perfil de crises epiléticas induzidas por ácido cáínico na dose de 5mg/kg.** Perfil de crise avaliado ao decorrer de 60 minutos. A análise é representada pela mediana  $\pm$  intervalo interquartil, n=5 (A). Intensidade de crise representada pela área sob a curva ao longo de cinco intervalos de tempo (B). Tempo em que os grupos permaneceram em escore 5 e 6 ao longo de 60 minutos. Análise foi realizada utilizando a ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni,  $*=p<0.05$  (C). Tempo de latência de convulsão. Análise realizada utilizando a ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni,  $*=p<0,05$  (D).

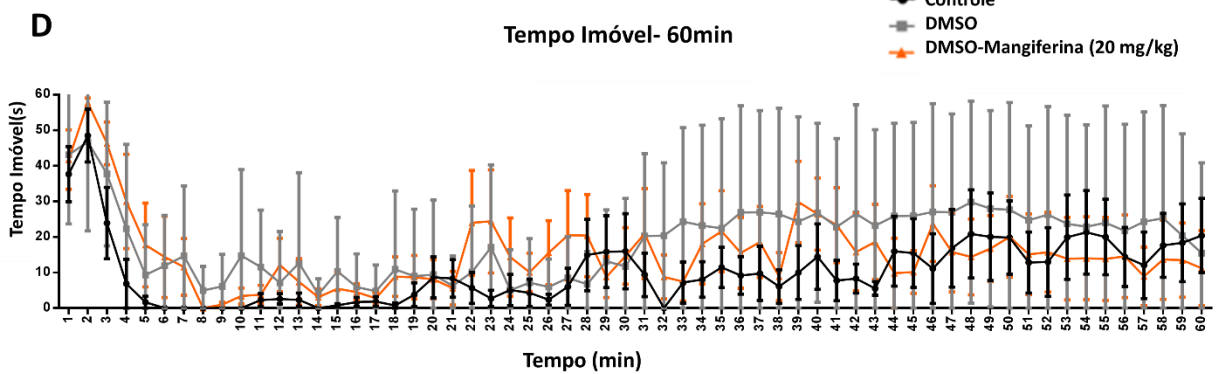
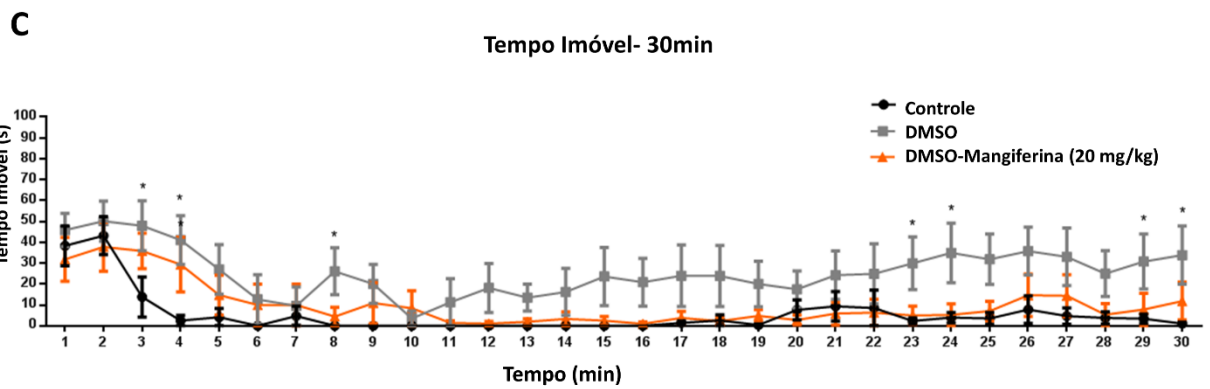
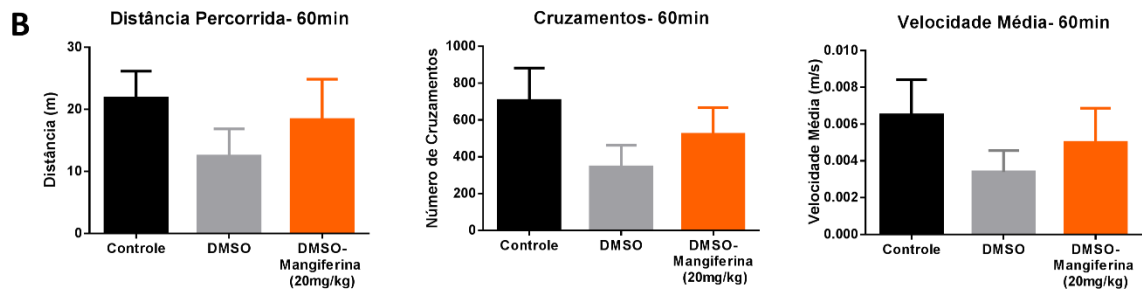
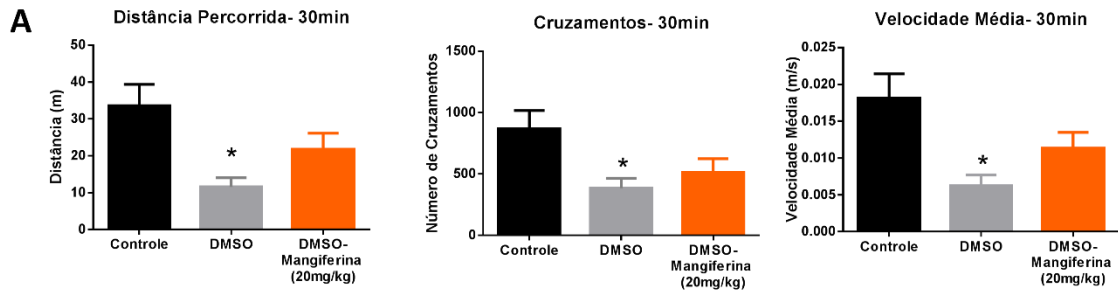


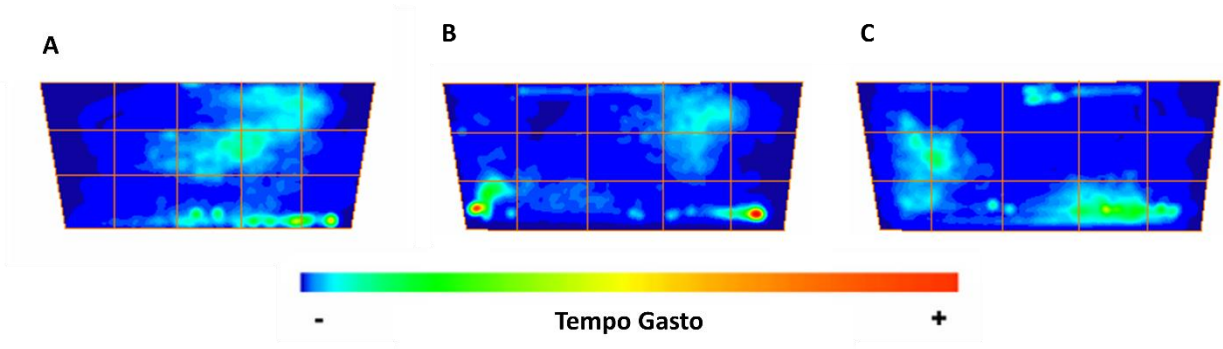


---

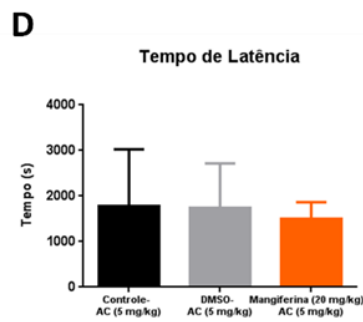
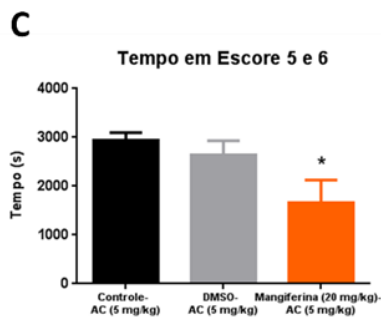
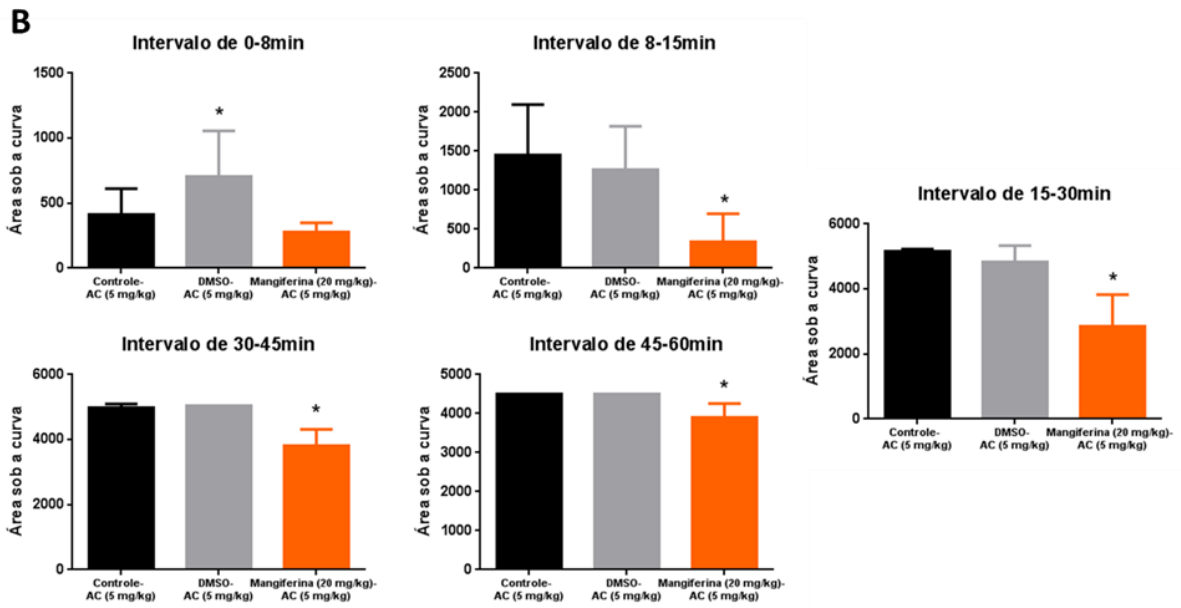
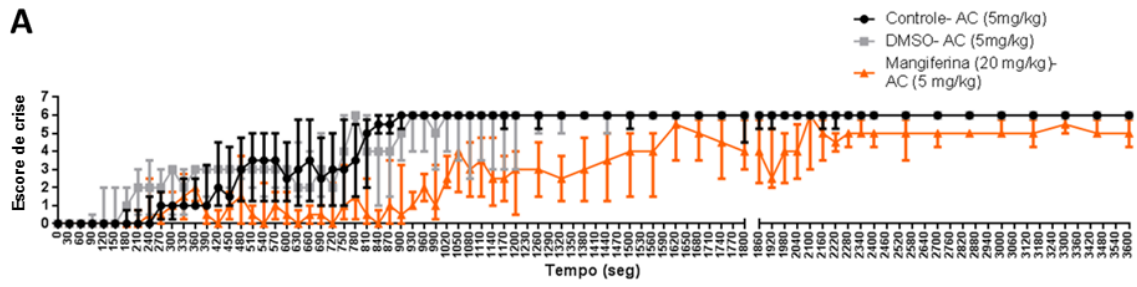
<b>SCORES</b>	
<b>Estágio I</b>	Imobilidade e hiperventilação.
<b>Estágio II</b>	Nado circular.
<b>Estágio III</b>	Movimentos erráticos (movimentos rápidos esquerda-direita).
<b>Estágio VI</b>	Contrações musculares anormais e espasmódicas.
<b>Estágio V</b>	Convulsões generalizada tipo-clônica.
<b>Estágio VI</b>	Perda de postura com espasmos por vários minutos.
<b>Estágio VII</b>	Morte

---









### **3 CONCLUSÃO**

Uma vez evidenciado que a mangiferina per se não interfere no comportamento do peixe-zebra, conseqüentemente não interferiu na análise do perfil de crise, esse estudo mostrou, baseado nos resultados do perfil de e intensidade de crise e tempo em escores 5 e 6, que a mangiferina na dose de 20 mg/kg possui um potencial efeito anticonvulsivante em peixe-zebra submetidos ao modelo de convulsão por AC.

#### **4 PERSPECTIVAS**

Tem-se ainda como perspectiva aumentar o grupo amostral nos experimentos de indução de crises epiléticas, bem como analisar o efeitos da mangiferina em peixes-zebra submetidos a outros modelos de crises, como o modelo induzido pelo PTZ já descritos pelo nosso grupo de pesquisa.

## REFERÊNCIAS

1. **Bradford, H. F.** Glutamate, GABA and Epilepsy. *Progress in Neurobiology*. Vol. 47. pp. 477-511, 1995.
2. **Adam Michael Stewart, Daniel Desmond, Evan Kyzar, Siddharth Gaikwad, Andrew Roth.** Perspectives of zebrafish models of epilepsy: What, how and where next? *Brain Research Bulletin*. 135– 143, 2012.
3. **H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, R.J. Flower.** *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2007, p. 575.
4. **Kao-Chang Lin, Chia-Chuan Wang, Su-Jane Wang.** Bupropion attenuates kainic acid-induced seizures and neuronal cell. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological*. 207–214, 2013.
5. **Lothman EW, Bertram EH, Bekenstein JW, Perlin JB.** Self-sustaining limbic status epilepticus induced by 'continuous' hippocampal stimulation: electrographic and behavioral characteristics. *Epilepsy Research*. Mar-Apr;3(2):107-19, 1989.
6. **Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM.** Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*. Nov-Dec;34(6):985-95., 1993.
7. **Lukasiuk K, Kontula L, Pitkänen A.** cDNA profiling of epileptogenesis in the rat brain. *The European Journal of Neuroscience*. Jan;17(2):271-9, 2003.
8. **Prince DA, Wong RK.** Human epileptic neurons studied in vitro. *Brain Research*. Apr 6;210(1-2):323-33, 1981.
9. **Schwartzkroin PA, Knowles WD.** Intracellular study of human epileptic cortex: in vitro maintenance of epileptiform activity? *Science*. Feb 17;223(4637):709-12, 1984.
10. **Maxime Lévesquea, Massimo Avoli.** The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2013.

11. **Murakami, S., Takemoto, T., Shimizu, S.** Studies on the effective principles of *Diagenea simplex* Aq. I. Separation of the effective fraction by liquid chromatography. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan.* 73, 1026–1028, 1953.
12. **Stables JP, Bertram EH, White HS, Coulter DA, Dichter MA, Jacobs MP, Loscher W, Lowenstein DH, Moshe SL, Noebels JL, Davis M.** Models of Epilepsy and Epileptogenesis: Reporto of NIH Workshop, Bethesda, Maryland. *Epilepsia.* Nov;43(11):1410-20, 2002.
13. **Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C.** The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society.* Feb;83(1):13-34, 2008.
14. **Vascotto SG, Beckham Y, Kelly GM.** The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochemistry and cell biology.* 75(5):479-85, 1997.
15. **Lele Z, Krone PH.** The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology advances.* 14(1):57-72., 1996.
16. **Gerlai R, Lee V, Blaser R.** Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacology, biochemistry, and behavior.* Dec;85(4):752-61, 2006.
17. **Blaser R, Gerlai R.** Behavioral phenotyping in zebrafish: comparison of three behavioral quantification methods. *Behavior research methods.* Aug;38(3):456-69 de 2006.
18. **Rosemberg DB, Rico EP, Mussulini BH, Piato AL, Calcagnotto ME, Bonan CD, Dias RD, Blaser RE, Souza DO, de Oliveira D.** Differences in Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish in the Open Tank Paradigm after a Short-Period Confinement into Dark and Bright Environments. *PLoS One.* 2011.
19. **Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD, Johnson SL.** The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome research.* Sep;10(9):1351-8, 2000.
20. **Ebarasi L, Oddsson A, Hultenby K, Betsholtz C, Tryggvason K.** Zebrafish: a model system for the study of vertebrate renal development, function, and pathophysiology. *Current opinion in nephrology and hypertension.* Jul;20(4):416-24, 2011.

21. **Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A.** Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. Dec;67(4):773-82, 2000.
22. **Lieschke GJ, Currie PD.** Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature reviews. Genetics*. May;8(5):353-67, 2007.
23. **Ralph Nelson, Andrew. T. Janis, Toby N. Behar, Victoria P. Connaughton.** Physiological responses associated with kainate receptor immunoreactivity in dissociated zebrafish retinal neurons: a voltage probe study. *Progress in brain research*. 131:255-65, 2001.
24. **Ibarretxe G, Sánchez-Gómez MV, Campos-Esparza MR, Alberdi E, Matute C.** Differential Oxidative Stress in Oligodendrocytes and Neurons After Excitotoxic Insults and Protection by Natural Polyphenols. *Glia*. Jan 15;53(2):201-11, 2006.
25. **Campos-Esparza MR, Sánchez-Gómez MV, Matute C.** Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. *Cell Calcium*. Apr;45(4):358-68, 2009.
26. **Sattler R, Tymianski M.** Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *Journal of molecular medicine : official organ of the "Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte"*. 78(1):3-13, 2000.
27. **Garrido G, González D, Lemus Y, García D, Lodeiro L, Quintero G, Delporte C, Núñez-Sellés AJ, Delgado R.** In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. Aug;50(2):143-9, 2004.
28. **Guha S, Ghosal S, Chattopadhyay U.** Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy*. Nov-Dec;42(6):443-51, 1996.
29. **Ichiki H, Miura T, Kubo M, Ishihara E, Komatsu Y, Tanigawa K, Okada M.** New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. *Biological & pharmaceutical bulletin*. Dec;21(12):1389-90, 1998.
30. **Yoshimi N, Matsunaga K, Katayama M, Yamada Y, Kuno T, Qiao Z, Hara A, Yamahara J, Mori H.** The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring

glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats. *Cancer Letters*. Feb 26;163(2):163-70, 2001.

31. **Leiro J, Arranz JA, Yáñez M, Ubeira FM, Sanmartín ML, Orallo F.** Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *International immunopharmacology*. Jun;4(6):763-78, 2004.

32. **Gottlieb M, Leal-Campanario R, Campos-Esparza MR, Sánchez-Gómez MV, Alberdi E, Arranz A, Delgado-García JM, Gruart A, Matute C.** Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiology of disease*. Aug;23(2):374-86, 2006.

33. **Juan M. Alfaro, Jorge Ripoll-Gómez and Javier S. Burgos.** Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. *European Journal of Neuroscience*. 2011, Vols. 33, 1252–1255.

34. **Goldsmith P.** Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology*. Oct;4(5):504-12, 2004.