MARIANA DE SOUZA ARANHA GARCIA GOMES

Caracterização do camundongo mutante audiogênico tremor como novo modelo de epilepsia: estudo de neurotransmissores e citocinas pró-inflamatórias no hipocampo

> São Paulo 2022

MARIANA DE SOUZA ARANHA GARCIA GOMES

Caracterização do camundongo mutante audiogênico tremor como

novo modelo de epilepsia: estudo de neurotransmissores e citocinas

pró-inflamatórias no hipocampo

versão corrigida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori

São Paulo 2022 Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4220 FMVZ	Gomes, Mariana de Souza Aranha Garcia Caracterização do camundongo mutante audiogênico <i>tremor</i> como novo modelo de epilepsia: estudo de neurotransmissores e citocinas pró-inflamatórias no hipocampo / Mariana de Souza Aranha Garcia Gomes. – 2022. 94 f. : il.
	Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2022.
	Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada. Orientadora: Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori.
	1. Camundongo <i>tremor</i> . 2. Neurotransmissores. 3. Citocinas pró-inflamatórias. 4. Fenótipo comportamental. 5. Neuroinflamação. I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.



Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização do camundongo mutante audiogênico tremor como novo modelo de epilepsia: estudo de neurotransmissores e citocinas pró-inflamatórias no hipocampo.", protocolada sob o CEUA nº 4864190717 (ID 004187), sob a responsabilidade de **Cláudia Madalena Cabrera Mori** *e equipe; Mariana de Souza Aranha Garcia Gomes; Silvia Maria Gomes Massironi; Maria Martha Bernardi* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 25/10/2017.

We certify that the proposal "Characterization of the audiogenic mutant mice tremor as a new model of epilepsy: evaluation of neurotransmitters and proinflammatory citokynes in hippocampus.", utilizing 88 Isogenics mice (males and females), 48 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 4864190717 (ID 004187), under the responsibility of **Cláudia Madalena Cabrera Mori** and team; Mariana de Souza Aranha Garcia Gomes; Silvia Maria Gomes Massironi; Maria Martha Bernardi - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/25/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 08/2017 a 08/2021 Área: Patologia Experimental E Comparada

Origem:	Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ	USP					
Espécie:	Camundongos isogênicos se	exo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 18 semanas	N:	88
Linhagem:	C57BL/6 e C57BL/6 tremor			Peso:	1 a 300 g		
Origem:	Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP						
Espécie:	Camundongos heterogênicos se	exo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 18 semanas	N:	48
Linhagem:	Swiss e Swiss tremor			Peso:	1 a 200 g		

Local do experimento: Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP.

São Paulo, 12 de julho de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária: Armando de Salles Oliveira CEP 05508-270 São Paulo/SP - Brasil - tel: 55 (11) 3091-7676 Horário de atendimento: 2º a 5º dos 7h30 às 16h : e-mail: ceuavet@usp.br CEUA N 4664190717



Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

> São Paulo, 18 de março de 2020 CEUA N 4864190717 (ID 005939)

llmo(a). Sr(a). Responsável: Cláudia Madalena Cabrera Mori Área: Patologia Experimental E Comparada

Título da proposta: "Caracterização do camundongo mutante audiogênico tremor como novo modelo de epilepsia: estudo de neurotransmissores e citocinas pró-inflamatórias no hipocampo.".

CERTIFICADO (Emenda versão de 04/novembro/2019)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 04/novembro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O manuscrito "Behavioral and neurochemical characterization of the spontaneous mutation tremor, a new mouse model of epilepsy[] foi submetido para publicação no periódico Epilepsy & Behavior e apresentado para o exame de qualificação em setembro de 2019. No exame de qualificação, e após apreciação do manuscrito pelos revisores do periódico, foram apontadas algumas correções no trabalho incluindo a necessidade de se realizar experimentos complementares visando caracterizar a crise epilética nos camundongos mutantes. Desta forma, propomos modificações no projeto com exclusão de alguns experimentos e inclusão de testes adicionais para caracterizar a crise epilética nesse modelo animal. ".

 Animais a serem adicionados

 Origem:
 Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP

 Espécie:
 Camundongos heterogênicos
 sexo:
 Machos e Fêmeas
 idade:
 1 a 18 semanas
 N:
 54

 Linhagem:
 Swiss e Swiss tremor
 Peso:
 1 a 200 g
 1 a 200 g
 1 a 200 g

Comentário da CEUA: Devido a solicitações feitas durante a qualificação e pelos revisores da revista científica, foram propostas algumas modificações no projeto com exclusão de alguns experimentos e inclusão de testes adicionais para caracterizar a crise epilética nesse modelo animal. Não há óbices para a realização destas alterações.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

bamillaflotaflender

Camilla Mota Mendes Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GOMES, Mariana de Souza Aranha Garcia

Título: Caracterização do camundongo mutante audiogênico tremor como novo modelo de epilepsia: estudo de neurotransmissores e citocinas próinflamatórias no hipocampo.

> Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/___/____/

Banca Examinadora

Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	

Dedicatória: Dedico essa tese a todo e qualquer animal (humano ou não-humano) que sofra com qualquer doença neurológica. Se existir a mais remota chance de esse trabalho melhorar a sua vida: isso é o que me mantém aqui. (Em especial: Debs, Gabi e Madona).

AGRADECIMENTOS

Acredito que agradecer faz parte do processo de reconhecer que nada é feito sozinho.

Tendo isso em mente, gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização desse doutorado.

Primeiramente aos meus pais e irmãos por todo o amor, carinho, broncas (necessárias) e apoio que me deram – sempre – para me preparar para o mundo aqui fora, nosso ninho era muito mais aconchegante. Obrigada por tudo. Aos meus irmãos: sei que mesmo longe estamos sempre voando juntos.

Ao meu marido Gabriel - obrigada pela paciência e por escolher voar ao meu lado.

Aos meus amigos mais próximos. Thais, Vivi, João, André e Carol. O mundo é muito melhor com vocês. Acredito que amigos se reconhecem ao longo da vida, tivemos a felicidade de nos reconhecer logo no início dela – não consigo nem imagin ar como ela seria sem vocês.

A um anjo chamado Ricardo Fragnani – se não fossem: a sua paciência e a sua calma eu provavelmente sequer caminharia sozinha hoje. E ao incrível neurologista Marcelo Prudente sem você eu com certeza não caminharia sozinha.

À minha orientadora Claudia Mori que ao longo de mais essa jornada reafirmou o quanto é incrível. Por sempre ter a coisa certa a dizer e por sempre tornar o trabalho no nosso grupo algo imensamente prazeroso. Ter você nesse caminho tornou tudo possível, e sem dúvidas, muito mais fácil.

A todos os professores e funcionários do departamento que de forma direta ou indireta ajudaram.

Ao meu grupo de trabalho sempre pronto para resolver qualquer problema. Obrigada por ter me permitido confiar meu projeto a vocês. Tive a sorte de poder fazer amigos no trabalho, e a ajuda de vocês foi muito mais do que eu poderia sequer pedir. Meu grupo permite que eu ame meu trabalho, e não somente que eu trabalhe com o que eu amo. Obrigada e contem comigo sempre. Aos colaboradores do trabalho como um todo, principalmente Orfa Yineth Galvis-Alonso, Jorge Mejia Cabeza, Silvia Massironi e Martha Bernardi, do fundo do meu coração, obrigada por todo o conhecimento passado e discutido. A contribuição de vocês para que isso acontecesse foi imprescindível. Vocês são incríveis. O mundo precisa de mais pessoas como vocês. Muito obrigada.

Entre os colegas de trabalho: Dennis Zanatto. Não existem palavras para descrever o prazer que eu tenho em trabalhar com você e de ter em você um dos meus melhores amigos. Obrigada. Conte comigo sempre.

Aos colegas pós-graduandos do departamento e da faculdade, principalmente aqueles que ao longo de tanto tempo se tornaram amigos. Jilma, Gilbert, Marina, Jessica, Cintia, Samira, Juliana e Débora entre tantos outros. Muito obrigada.

Ao laboratório de farmacologia do VPT. Muito obrigada.

À equipe do biotério do departamento de Patologia – Luciana, Nelsinho e Mauro. A companhia e a ajuda de vocês foram imprescindíveis. Muito obrigada.

Em especial ao Mauro Mattos, ex-funcionário do biotério, por – em um dia normal de trabalho - ter percebido que naquela caixa havia filhotes diferentes dos outros – e ter acreditado na sua desconfiança de que eles deveriam ser estudados. Sem você – literalmente – nada disso teria sido possível. Muitíssimo obrigada. Se o mundo tivesse mais pessoas como você, a ciência – sem qualquer dúvida – estaria muito mais avançada.

À Alexandra Elbakyan por acreditar que a ciência não deve ter fronteiras, e incentivar que isso aconteça.

À CAPES por ter acreditado nesse projeto, ter concedido a bolsa de pesquisa que tornou isso realidade. Código de financiamento 001.

Aos animais que involuntariamente deram a vida pela ciência para que esse estudo se concretizasse - o que cabe a mim é garantir que não tenha sido em vão.

Esse trabalho é – sem dúvida alguma – de vocês também, a ajuda de cada um foi essencial.

"If the human brain were so simple that we could understand it. We would be so simple that we couldn't."

Emerson Pugh

RESUMO

GOMES, M.S.A.G. Caracterização do camundongo mutante audiogênico tremor como novo modelo de epilepsia: estudo de neurotransmissores e citocinas pró-inflamatórias no hipocampo. 2002. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O camundongo mutante espontâneo tremor (tr) foi identificado no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A mutação foi assim denominada pois a primeira característica fenotípica aparente dos animais foi o tremor ao se movimentarem. A mutação, autossômica recessiva, foi inicialmente observada em camundongos Swiss, e mais tarde, por meio de dez retrocruzamentos, foi transferida para a linhagem congênica C57BL/6 (N10), pois isso possibilitaria o mapeamento genético para encontrar a mutação. Além do tremor a característica mais marcante desses mutantes foi a presença de convulsões clônicas de origem audiogênica, crises reflexas que se encaixam no diagnóstico de epilepsia, fazendo com que esses camundongos sejam considerados um novo modelo animal para o estudo desta disfunção. Para aprimorar a caracterização do mutante tremor foram estudadas suas respostas em testes comportamentais e o seu desenvolvimento pós-natal físico e de reflexos. Com os resultados do desenvolvimento pós-natal identificou-se que os mutantes tremor apresentaram alterações, como incoordenação motora e diminuição das respostas similares as de ansiedade, somente após o desmame, ou seja na terceira semana de vida. Resultados preliminares do mapeamento genético utilizando marcadores microssatélites distribuídos pelo genoma do camundongo, indicaram que a mutação se encontraria no cromossomo 14, na região entre 33,21 e 38,21cM, tendo como gene candidato mais provável o Egr3; entretanto, o sequenciamento realizado pelo método Sanger não apresentou alterações quando comparado aos camundongos controle (Wild Type – WT). Para a caracterização das crises epilépticas os camundongos foram expostos à estímulo acústico com frequência de 20kHz, apresentando convulsão audiogênica clônica generalizada. Trinta minutos após a convulsão a expressão de RNA mensageiro (mRNA) do gene candidato Egr3 e dos genes Gabra1 e Gabra 4, descritos na literatura como relacionados ao surgimento e ao desenvolvimento de convulsões, foi quantificada no hipocampo por qRT-PCR. Foi quantificada também a expressão das citocinas pró-inflamatórias Tnf-α, II-1β, II-6, Ccl2 e Ccl3. Os

neurotransmissores, e seus metabólitos, que são considerados importantes para o desenvolvimento e controle das crises epilépticas foram quantificados por HPLC, sendo eles: ácido γ-amino butírico (GABA), glutamato (GLU), glicina (GLY), aspartato (ASP), dopamina (DA), ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanilico (HVA), noradrenalina (NOR) ácido vanilmandélico (VMA), serotonina (5-HT) e ácido 5 hidroxi indol acético (5HIAA). Quando comparados aos camundongos WT os mutantes tremor apresentaram aumento na concentração de GABA, GLU, ASP, NOR e neurotransmissores da via serotoninérgica e diminuição dos níveis de HVA e de GLY no hipocampo. Em relação à expressão gênica, observou-se superexpressão de II-1ß e Ccl3 no hipocampo dos camundongos tremor naive, com diminuição significativa 30 minutos após a convulsão. Ao contrário, a expressão de Gabra1 e Gabra4 que se encontrava diminuída no hipocampo dos camundongos tremor naive, aumentou após a convulsão. Esses resultados indicaram que os genes Egr3, Gabra 1 e 4 e as citocinas II-1β e Ccl3 estão envolvidos no mecanismo de surgimento e desenvolvimentos das convulsões no mutante tremor, que pode ser caracterizado como um novo modelo animal para estudo de epilepsia.

Palavras-chave: Camundongo *tremor.* Neurotransmissores. Citocinas próinflamatórias. Fenótipo comportamental. Neuroinflamação.

ABSTRACT

GOMES, M.S.A.G. Characterization of the audiogenic mutant mice tremor as a **new model of epilepsy**: evaluation of neurotransmitters and proinflammatory citokynes in hippocampus. 2022. 94 f (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The spontaneous mutant mice tremor (tr) was identified in the animal facility of the Department of Pathology from Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -Universidade de São Paulo. The mutation was named tremor because the first phenotypic characteristic seen in these mice was the tremor when moving. This autossomal recessive mutation was firstly observed in Swiss mice, and then transferred to C57BL/6 by ten backcrosses (N10), as this would allow genetic mapping to find the mutation. Besides tremor, the most important characteristic of this mutant is the presence of audiogenic tonic seizures, that are reflex seizures that fits the epilepsy diagnostic, making these mice a new animal model to study or this disease. To improve behavioral characterization of mutant tremor, their results in behavior tests were analyzed along their postnatal physical and reflexology development. Postnatal development analysis made possible to identify that mutant tremor presents changes, such as motor impairment and decreased anxiety-like responses, only after third week of life, at the weaning. Primary results of genetic mapping using microsatellite markers distributed by the mouse genome, indicated that the mutation is in chromosome 14 (between 33.21 and 38.21cM), making Egr3 an important candidate gene, even though the sequencing performed by Sanger method of tremor sample did not show differences when compared to wild type (WT) mice. Regarding the characterization of epileptic seizures mice were exposed to a sound stimulus at a frequency of 20kHz, presenting audiogenic clonic seizures. Thirty minutes after seizure the expression of mRNA of candidate gene (Egr3) and other important genes (Gabra1 and 4), known in literature to be important in epileptogenesis, were quantified in hippocampus by real time PCR (qRT-PCR). Proinflammatory cytokines (Tnf- α , II-1 β , II-6, Ccl2 e Ccl3) expression. were quantified. Neurotransmitters, and it metabolites, that are also considered important for epileptogenesis and it epilepsy control were quantified by HPLC, such as yamino butyric acid (GABA), glutamate (GLU), glycine (GLY), aspartate (ASP), dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA),

noradrenalin (NOR), vanilliyImandelic acid (VMA), serotonin (5-HT) and 5-Hydroxyindoleacetic acid (5HIAA). Comparing to WT mice, tremor presented raised levels of GABA, GLU, ASP, NOR and neurotransmitters of seroroninergic pathways, and decrased levels HVA and GLY in hippocampus. Considering gene expression, an overexpression of II-1 β and Ccl3 was observed in hippocampus of naive mice, and a significant decrease thirdy minutes after seizures. On the other hand, decreased expression of Gabra 1 and 4 found in hippocampus of naive mice raised after seizure. These results showed that genes Egr3, Gabra 1 and 4 and cytokines II-1 β and Ccl3 are involved in epileptogenesis of mutant tremor, which can be characterized as a new model to study epilepsy.

Keywords: *tremor* mice. Neurotransmitters. Proinflammatory cytokines. Behavioral phenotype. Neuroinflammation.

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 DEFINIÇÕES	19
1.2 TIPOS DE CRISES	20
1.3 MECANISMO GABAérgico NAS CRISES EPILÉPTICAS	23
1.4 MODELOS ANIMAIS	23
1.4.1 Induzidos por agentes químicos	24
1.4.2 Estimulação elétrica	27
1.4.3 Outros modelos	
1.4.4 Predisposição genética	29
1.5 NEUROINFLAMAÇÃO	32
1.5.1 Neuroinflamação e epilepsia	33
2 OBJETIVOS	36
3 CAPÍTULO 1 Behavioral and neurochemical characterization	on of the
spontaneous mutation tremor, a new mouse model of a	udiogenic
seizures	37
3.1 INTRODUCTION	39
3.2 MATERIAL AND METHODS	40
3.2.1 Mice	40
3.2.2 Ethics statement	41
3.2.3 Genetic mapping and candidate gene sequencing	41
3.2.4 Egr3 and Gabra1 gene expression	42
3.2.5 Evaluation of postnatal development	42
3.2.6 Behavioral phenotyping	43
3.2.7 Response to acoustic stimuli	45
3.2.8 Measurement of CNS neurotransmitters and its metabolites	45
3.2.9 Statistical analysis	46
3.3 RESULTS	46
3.3.1 Genetic mapping and candidate gene sequencing	46
3.3.2 Egr3 and Gabra1 receptor subunit gene expression	47
3.3.3 Evaluation of postnatal development	47
3.3.4 Behavioral phenotyping	47
3.3.5 Response to acoustic stimuli	49
3.3.6 Measurement of CNS neurotrasmitters and it metabolites	49

SUMÁRIO

3.4 DISCUSSION	49
3.5 CONCLUSIONS	55
3.6 REFERENCES	56
FIGURE AND TABLE CAPTIONS	63
4 CAPÍTULO 2. Alteration of hippocampal Egr3, GABA A re	eceptors, II-1β and
Ccl3 expression in audiogenic <i>tremor</i> mice after seizure	70
4.1 INTRODUCTION	72
4.2 MATERIAL AND METHODS	74
4.2.1 Ethics Statement	74
4.2.2 Mice	74
4.2.3 Acoustic Stimuli	75
4.2.4 Gene Expression	75
4.2.5 Statistical Analysis	76
4.3 RESULTS	77
4.3.1 Response to Acoustic Stimuli	77
4.3.2 Gene Expression	77
4.4 DISCUSSION	78
4.5 CONCLUSIONS	80
4.6 REFERENCES	81
FIGURES	85
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
6 REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

O primeiro livro conhecido, que descreve um fenômeno que hoje entendemos ser uma crise epiléptica, foi escrito por Hipócrates - cerca de 400 a.C. - ele defendeu que a epilepsia era uma disfunção cerebral e não uma maldição causada por deuses, como se acreditava na época (MASIA; DEVINSKY, 2000). Mesmo com definições atualizadas e com o conhecimento que temos hoje para descartar o aspecto dogmático como possível causa, o diagnóstico de epilepsia é constantemente revisado, atualizado e discutido pela Liga Internacional Contra Epilepsia (em inglês: International League Against Epilepsy – ILAE) (EPILEPSY, 2022), sendo essa uma disfunção que afeta 0,8% da população mundial – segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (FISHER *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2011; WHO, 2019).

Alguns autores descrevem a epilepsia como uma diversificada família de disfunções, que têm em comum a anormal predisposição a crises epilépticas, referindose a elas com o termo no plural "epilepsias" (FISHER *et al.*, 2005). Ao considerar a dificuldade de definir as possíveis causas de uma crise epiléptica, é importante lembrar que esta pode se manifestar de diversas formas – o que resulta em certa complexidade para estudá-la.

Uma forma que tem se mostrado eficaz para estudar a epilepsia envolve o uso de modelos animais, como o camundongo por exemplo. O camundongo é reconhecido como um importante modelo na investigação de processos fisiológicos e patológicos, e tem o estudo do seu genoma muito desenvolvido - assim como o estudo do genoma humano – o que permitiu que os resultados obtidos em testes com camundongos fossem utilizados para prever os resultados obtidos na espécie humana com grande assertividade (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

Diversos modelos animais já foram selecionados para o estudo de crises epilépticas, sendo que as principais formas de indução dessas crises são divididas em: indução agentes químicos, estimulação elétrica ou predisposição genética. Esta predisposição genética é causada por uma mutação aleatória que, nesse caso, causa alterações neurológicas que levam à predisposição a crises epilépticas (GOMES, 2018).

No Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na colônia de camundongos Swiss, surgiu espontaneamente uma mutação denominada "*tremor*", mutação pontual, e não derivada de vários genes, de origem autossômica recessiva, denominada dessa forma pois a primeira característica fenotípica observada foi a presença de tremores enquanto os animais se locomoviam. Posteriormente, por meio de 10 retrocruzamentos (N10), a mutação foi transferida para a linhagem C57BL/6, estabelecendo assim a linhagem congênica C57BL/6 *tremor*. A transferência do fenótipo mutante para uma linhagem isogênica possibilitou a busca do gene mutante através do mapeamento genético. Estudos posteriores permitiram caracterizar estes camundongos como modelo espontâneo de crises epilépticas de origem audiogênica (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

Estudos sobre o desenvolvimento pós-natal físico e de reflexos dos camundongos *tremor* possibilitaram afirmar que os camundongos mutante não apresentam diferenças durante o desenvolvimento entre os mutantes e os animais controle (ou Wild Type - WT), fato que confirma a hipótese inicial de que o fenótipo só pode ser reconhecido após a 3ª semana de vida (momento do desmame), o que pode indicar que a alteração tem caráter de doença degenerativa, uma vez que o desenvolvimento dos filhotes *tremor* não apresenta déficits em relação aos filhotes WT, e alterações como déficit na coordenação motora ou aumento da atividade geral, foram observadas em camundongos *tremor* a partir dos 21 dias de vida (GOMES, 2018).

Para ajudar na identificação da mutação parâmetros comportamentais do mutante tremor foram estudados, uma vez que uma melhor caracterização do fenótipo ajudaria na comparação com outras mutações. A base de dados do MGI (Mouse Genome Informatics – Jackson) foi utilizada com a fim de selecionar os modelos animais, que já tinham a sua mutação descrita, que apresentavam fenótipo semelhante ao do mutante tremor. O mapeamento genético foi realizado utilizando marcadores microssatélites distribuídos pelo genoma do camundongo e foi identificado que a mutação se encontra no cromossomo 14, no intervalo de 5cM entre D14Mit37 (33,21cM) e D14Mit115 (38,21 cM). Uma vez determinada a região foi possível diminuir a lista das mutações que continham características fenotípicas semelhantes às do mutante tremor e selecionar um gene candidato para que fosse realizado o seguenciamento da mutação. O mutante que apresentou características mais semelhantes às do camundongo mutante tremor foi o camundongo knockout do gene Egr3 (Early Growth Response 3), fazendo assim com que esse gene se tornasse o candidato a ser estudado por possivelmente carregar a mutação causadora das alterações do camundongo tremor. Esse camundongo knockout apresenta locomoção exagerada e aumento da hiperatividade, assim como foi

observado em mutantes *tremor* nos testes de atividade geral em campo aberto, suspensão pela cauda e nado forçado (GALLITANO-MENDEL *et al.*, 2007), observações que aumentam as semelhanças entre esses modelos.

Uma vez encontrado um gene candidato, foi realizado o sequenciamento genético da mutação *tremor* em fundo genético C57BL/6 com DNA genômico por método Sanger. Foram selecionados dois genes Egr3: Egr3-204 (2 exons, 3940 pb e 387aminoácidos) e Egr3-201 (3 exons, 1509 pb e 349 aminoácidos), entretanto, com o sequenciamento dos exons não foram encontradas mutações, o que indica que a mutação pode estar em outra região ou nos intros, possivelmente na expressão destes genes.

O gene Egr3 é um dos fatores de transcrição da família *zinc-finger*, envolvido na inervação e formação do fuso mitótico (TOURTELLOTTE; MILBRANDT, 1998). Estudos aprofundados com o gene Egr3 mostram que ele está também associado à modulação de receptores GABA-érgicos no hipocampo, mais especificamente nos receptores do tipo GABAA subtipos α 1 e α 4 (BROOKS-KAYAL; RAOL; RUSSEK, 2009), sendo que López-López (2017) relacionou a sua super-expressão à susceptibilidade a convulsões audiogênicas em modelos animais, o que corrobora ainda mais com a hipótese de que este gene está envolvido com a mutação *tremor* uma vez que esse mecanismo pode também estar envolvido na ocorrência das convulsões dos camundongos *tremor* mostraram que animais que recebem Diazepan (0,5mg/kg via s.c.) administrado via subcutânea não apresentam convulsão mesmo quando estimulados por estímulo sonoro, o que comprova a relação das convulsões com as vias GABAérgicas do SNC, uma vez que esta droga tem função sobre estes neurotransmissores.

Estudando outros modelos espontâneos de convulsão audiogênica, como os ratos Wistar Audiogenic Rats (WARs) ou os hamsters Genetic Audiogenic Seizure Hamster (GASH:Sal) os autores observaram que os genes da família Egr tem um papel importante no desenvolvimento destas crises (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2017). Estes e outros modelos de crise audiogênica também são comumente associados a alterações patológicas da atividade sináptica principalmente mediada por neurotransmissores, e para melhorar compreensão do seu funcionamento: seus metabólitos, entre eles: ácido γ -amino butírico (GABA) e glutamato (GLU) mas também glicina (GLY) aspartato (ASP), dopamina (DA), ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanilico (HVA), noradrenalina (NOR) ácido vanilmandélico (VMA), serotonina (5-HT) e ácido 5 hidroxi indol acético (5HIAA). O que nos levou a quantificá-los no hipocampo do mutante *tremor* (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

O objetivo desse trabalho é caracterizar o camundongo mutante espontâneo *tremor* como modelo de crise epiléptica reflexa de origem audiogênica, portanto de epilepsia, e para tanto alguns pontos devem ser considerados.

1.1 DEFINIÇÕES

A palavra "epilepsia" tem a sua origem na língua grega – na palavra "epilambaneim", que tem o significado de "possuir", "apossar-se de" ou "acometer" (TILELLI et al., 2003). O diagnóstico de epilepsia foi atualizado pela última vez em 2014, pela ILAE - (International League Against Epilepsy) como: uma disfunção cerebral caracterizada pela predisposição de gerar crises epilépticas - quando essas crises ocorrem de forma não provocada¹ com um intervalo maior do que de 24 horas entre a primeira e a segunda; ou ainda: em indivíduos que, mesmo com uma única crise apresentam o limiar de probabilidade para a ocorrência da segunda muito baixo, o que aumentaria a chance da sua ocorrência, entretanto, ainda existem dúvidas de quais pontos são mais ou menos relevantes na hora de se estabelecer o diagnóstico. (FISHER *et al.*, 2014). Existem também as crises epilépticas reflexas, que são geradas a partir de um determinado estímulo, sonoro ou luminoso, por exemplo, e também são consideradas crises provocadas, entretanto se enquadram no diagnóstico de epilepsia, uma vez que a sua ocorrência está ligada a uma predisposição anormal (FISHER *et al.*, 2014)

Crises sintomáticas (ou provocadas²) não são características do diagnóstico de epilepsia. Ainda sobre o diagnóstico: é importante considerar que a epilepsia é comumente referida como uma doença, mas o mais correto é considerá-la como uma

¹ Não provocadas - são as crises em que não é possível estabelecer a fonte causadora (FISHER *et al.*, 2005).

² Sintomáticas – que são as crises em que é possível estabelecer uma fonte causadora – como alterações sistêmicas ou metabólicas, intoxicações ou abstinências ou ainda lesões no SNC (trauma, infecção, acidente vascular cerebral), entre outros fatores relacionados à injurias ao SNC. Uma vez que a fonte causadora dessa crise é conhecida é possível estabelecer o intervalo de tempo entre esse evento e a crise (BEGHI *et al.*, 2010; FISHER *et al.*, 2005).

disfunção ou um distúrbio, uma vez que normalmente sua causa está associada a uma predisposição do próprio indivíduo (FISHER *et al.*, 2014).

Uma crise epiléptica é caracterizada como um sintoma transitório decorrente de atividade neuronal anormal que ocorre de forma excessiva e síncrona (FISHER *et al.*, 2014). A forma que a crise ocorre depende de diversos fatores: como o seu local de origem, a forma que ela se propaga, a maturidade do cérebro em que ela ocorre, interações medicamentosas entre outros. Também são diversas as formas que essas crises podem se manifestar num organismo; essas manifestações podem ser: sensoriais, motoras, de função autonômica, de alteração da consciência, estado emocional, memória, cognição ou comportamento, sendo que cada tipo de crise apresentará pelo menos uma dessas manifestações, mas dificilmente um tipo de crise apresentará todas (FISHER *et al.*, 2005).

Dos diferentes tipos de crises possíveis é importante estabelecer que nem todas tem envolvimento motor, ou seja, nem todas são convulsivas - segundo a Liga Brasileira de Epilepsia (LBE) convulsão é a crise epilética em que há abalo motor (SOUZA, 2021).

1.2 TIPOS DE CRISES

Como descrito anteriormente, as formas que as crises epilépticas ocorrem dependem de diversos fatores, e para facilitar o seu estudo elas são subdivididas em alguns tipos, como é resumidamente demonstrado na figura 1, que foi adaptada da mais recente classificação proposta por Fisher e colaboradores (2017):



Figura 1: Classificação básica dos tipos de crises epilépticas

Adaptado de: (FISHER *et al.*, 2017; ROSS; COLEMAN, 1999). *As crises desconhecidas são aquelas em que não é possível caracterizá-las junto com as outras, ou que não se tem informação suficiente.

Inicialmente as crises são classificadas entre em parciais/focais, generalizadas ou de origem desconhecida:

Parciais / Focais:

São crises que envolvem até um hemisfério inteiro - mas não há envolvimento do segundo hemisfério - e a denominação está relacionada com o fato de que pode ser identificado o ponto onde os estímulos foram inicialmente gerados. Podem ser iniciadas em forma de "*déjà vu*" e evoluir para perda de consciência e de resposta por alguns minutos. Podem também evoluir para crises generalizadas (FISHER *et al.*, 2017). Suas subdivisões:

Conscientes: não ocorre perda de consciência; podem ser motoras, sensoriais, sensori-motoras, autonômicas vicerais ou cognitivas, sendo que essas duas últimas normalmente surgem como auras de convulsões complexas (FISHER, 1989).

Não conscientes: ocorre a perda ou o embotamento da consciência, normalmente surgem no sistema límbico - na amídala ou no hipocampo - e com pouca frequência: córtex temporal e estruturas fora dele, podem também ser motoras ou não (FISHER, 1989; FISHER *et al.*, 2017).

Generalizadas:

São as crises que apresentam envolvimento dos dois hemisférios do córtex; não necessariamente completos ou em áreas simétricas (FISHER *et al.*, 2017). Podem ser divididas em:

Ausências: Denominadas também como crises de pequeno mal (*petit mal*), frequentes em crianças e caracterizada por alguns segundos de ausência e olhar fixo, ou alguns movimentos automatizados, como pálpebra trêmula (FISHER, 1989; FISHER *et al.*, 2017).

Tônico-clônicas: Denominadas de crises de grande mal (*grand mal*), inicialmente há a perda da consciência, seguida de rigidez generalizada – em que ocorre a extensão dos membros (fase tônica) – seguida por espasmos musculares, dos membros e da face (CONRADSEN *et al.*, 2011), anteriormente eram subdivididas em três tipos: tônico, clônicas ou tônico-clônicas (FISHER *et al.*, 2017).

Desconhecidas: são denominadas desconhecidas as crises que não se encaixam nas outras categorias ou aquelas em que não existem informações suficientes para categorizá-las em outras crises (FISHER *et al.*, 2017).

Status epileticus (SE): segundo a ILAE (EPILEPSY, 2022); *Status epileticus* é uma condição que pode ser definida como: uma crise epilética que ocorre por um tempo prolongado, ou crises acontecendo em intervalos curtos o suficiente para produzir uma condição epilética invariável e duradoura (TRINKA *et al.*, 2015).

1.3 MECANISMO GABAérgico NAS CRISES EPILÉPTICAS

A crise epiléptica se inicia no SNC por dois motivos: elevada excitação ou baixa inibição na área em que a atividade neuronal anormal acontece, e nos dois casos essas atividades são mediadas por neurotransmissores. O principal neurotransmissor responsável pela inibição dessa atividade é o GABA. Existem dois tipos de receptores GABA(GABRA): GABRAA e GABRAB, sendo que o tipo A é responsável por hiperpolarizar os neurônios aumentando a entrada de cloro, tendo assim um efeito inibitório rápido, e os do tipo B diminuem a entrada de cálcio, gerando assim um efeito inibitório lento (TREIMAN, 2001). Diversos modelos animais de estudo de epilepsia apresentam anormalidades na expressão de GABRA, e mais especificamente, as subunidades 1 e 4, uma vez que o gene Egr3 já foi relacionado à expressão desses receptores (BROOKS-KAYAL; RUSSEK, 2012), como no caso que Roberts e colaboradores (2005) descreveram que camundongos *knockout* Egr3 tem níveis significativamente baixos de mRNA de GABRA α4 e supuseram que o Egr3 regula alterações na expressão de GABRA α4 após o *status epileticus*.

1.4 MODELOS ANIMAIS

A falta de conhecimento e de mecanismos para entender como se dão as crises epilépticas em humanos criou a necessidade de desenvolvimento de formas para estudá-las, e com isso surgiram os modelos animais – diferentes espécies que são submetidas a crises epilépticas por diferentes métodos de indução e assim nos ajudam a entender mais sobre esse distúrbio. Como já descrito anteriormente a epilepsia pode ocorrer por diversas causas o que torna mais difícil mimetizar as condições em laboratório. Pensando nessas variáveis é importante considerar que nenhum dos modelos já descritos até hoje é preditivo de todas as respostas clínicas, portanto, validado clinicamente para todas as formas de crise epiléptica, então o modelo a ser utilizado deve ser escolhido de acordo com a pergunta a ser respondida, as características que ele tem a esclarecer, e as suas limitações (FISHER *et al.*, 2014; KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014). Alguns desses modelos já descritos são:

1.4.1 Induzidos por agentes químicos

Acido caínico: em 1970 Shinozaki e colaboradores mostraram que a injeção de ácido caínico intraventricular era uma forma de induzir crises epiléticas em ratos, e assim criaram um modelo que é amplamente utilizado até hoje (SHINOZAKI; KONISHI, 1970a, 1970b). O ácido caínico é um análogo do Glutamato e tem importante efeito excitatório no SNC (SHINOZAKI; KONISHI, 1970b). Esse tipo de indução tem como principal alvo o hipocampo, causando injúrias restritas a essa área, uma vez que a maior parte de seus receptores está nessa parte do cérebro. Outros tipos de aplicação, como por exemplo de forma sistêmica, apresentam como dano colateral a sua ação não direcionada - que acarreta em danos em outras partes do organismo (SHINOZAKI; KONISHI, 1970b). Nesse modelo as convulsões se manifestam como crises focais originadas no sistema límbico ou de SE. Como limitações desse modelo podemos listar: a alta mortalidade dos animais (podendo chegar a 57% dependendo da linhagem (MCKHANN et al., 2003) e a alta variabilidade e gravidade com que as convulsões se manifestam. Esse modelo é ideal para mimetizar casos de humanos com danos no hipocampo (KANDRATAVICIUS et al., 2014). Esse modelo de indução também é amplamente utilizado em camundongos, sendo que os efeitos e a gravidade das crises são fortemente ligados à linhagem dos animais utilizados (MCKHANN et al., 2003).

Pilocarpina: o modelo foi primeiramente testado em ratos. A pilocarpina – um agonista de receptores muscarínicos de acetilcolina pode ser aplicada de forma sistêmica ou intrahipocampal. Similar ao modelo induzido por aplicação de ácido caínico, pelas suas manifestações - crises focais complexas e SE - e limitações similares, porém com lesões não restritas ao hipocampo, mas ocorrendo também no neocórtex – o que se assemelha ao que ocorre em humanos. Outra característica comum ao que ocorre em humanos é o déficit cognitivo e de memória (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014).

Pentilenotetrazol (PTZ): esse modelo é utilizado principalmente para estudo de crises agudas (DHIR, 2012). A aplicação de PTZ intracerebral ou intraperitoneal em camundongos ou ratos leva a ocorrência de convulsões clônicas, que são geradas principalmente no hipocampo. Quando aplicado em ratos foi observado um aumento da porção axonal da camada interna do hipocampo. O PTZ é considerado um agonista seletivo de GABA, sendo que os receptores GABAAα são bloqueados por ele

(SHINOZAKI; KONISHI, 1970b). A aplicação intracerebral demanda cirurgia estereotáxica para implantação de cânula, o que acaba sendo uma limitação para o uso do modelo, uma vez que essa técnica demanda habilidades específicas.

Hidróxido de alumínio: documentada pela primeira vez em 1942 por Kopeloff e colaboradores, a aplicação de creme de alumina (Oxido de Aluminio) no córtex de macacos causa crises convulsivas, entretanto o trabalho não especificou quais os tipos de crises que ocorriam (KOPELOFF; BARRERA; KOPELOFF, 1942). Mais tarde o mesmo grupo descreveu um protocolo usando Hidróxido de Alumínio (Al(HO)₃) que gerava crises simples do tipo focal, por exemplo quando aplicado diretamente no lobo temporal de macacos produzia crise focal nessa área – resultando em crises similares às que ocorrem em humanos (SHINOZAKI; KONISHI, 1970b). Esse modelo de aplicação no lobo temporal causa uma importante perda de terminações dendríticas no foco da crise epiléptica, entretanto causa um aumento das células da Glia e um aumento das conexões entre elas. Além dessas alterações celulares é observada também uma diminuição dos neurônios gabaérgicos e de terminais receptores de glutamato carboxilase (GAD) (SHINOZAKI; KONISHI, 1970b). Assim como o modelo de PTZ, esse modelo demanda cirurgia estereotáxica para aplicação da solução de Hidróxido de alumínio, o que dificulta a utilização do modelo.

Cobalto: aplicação de altas doses de cobalto (em pó ou fio metálico) no córtex motor de ratos resulta no surgimento de uma resposta similar ao SE em humanos, e alguns minutos depois se iniciam as primeiras convulsões tônico-clônicas (WALTON; TREIMAN, 1988). Sobre o mecanismo do GABA, Craig (1986) (apud (SHINOZAKI; KONISHI, 1970b) e colaboradores observaram que a sua síntese é interrompida durante a indução da crise epiléptica nesse modelo. É possível observar necrose no local da aplicação, que não ocorre na área contralateral. A hipótese de por que o Cobalto é um indutor de crises epiléticas se baseia no fato de que ao cruzar a barreira das células ele altera o canal de Ca²⁺ dos receptores permeáveis ao glutamato (BORBÉLY *et al.*, 2009; SHINOZAKI; KONISHI, 1970b). A aplicação do Cobalto deve ser feita por cirurgia estereotáxica, o que gera a mesma limitação dos últimos modelos.

Zinco: Em 1983 Pei e colaboradores desenvolveram um modelo de epilepsia tônico-clonica, aplicando sulfato de zinco intracerebral em coelhos (PEI *et al.*, 1983).

Esses modelos foram muito utilizados para o estudo de drogas anticonvulsivantes. Outros estudos mostraram que o Zn²⁺ pode bloquear alguns receptores GABAAα no hipocampo (SHINOZAKI; KONISHI, 1970b). Limitações similares às dos outros modelos que demandam cirurgia estereotáxica.

Flurothyl: esse composto geralmente é administrado em forma gasosa, e dependendo da dose utilizada pode causar convulsões de tônico-clônicas ou até SE quando em doses altas. O seu mecanismo de ação é desconhecido, mas uma das hipóteses é a de que ele abre os canais de Sódio (Na⁺), o que induz a atividade convulsiva (SHINOZAKI; KONISHI, 1970b). Estudos iniciais – entretanto de confiabilidade questionável – indicam que os efeitos do Flurothyl são idade e dose-dependentes o que pode dificultar a utilização do modelo (LOWENSTEIN; SIMON; SHARP, 1990).

Penicilina: Em 1945, Walker e colaboradores descreveram a aplicação intraventricular de Penicilina em macacos e gatos gerando convulsões (WALKER, 1945). Esse é um modelo de convulsão parcial, e que mimetiza a forma como essas ocorrem em humanos, entretanto não é um modelo de epilepsia, uma vez que qualquer atividade epiléptica desaparece depois de vinte e quatro horas da aplicação (DRAGIC; PAVLOVIC, 2004). A aplicação dessa substância também pode ser de outras formas, como intramuscular, intravenosa, intraperitoneal ou intracortical e as diferentes vias apresentam modelos com diferentes características: a aplicação intraperitoneal gera convulsões multifocais enquanto as aplicações intracorticais geram predominantemente convulsões corticais (RUBIO *et al.*, 2010).

Bicuculina: Esse modelo foi primeiramente descrito por Curtis em 1970, que descreveu a Bicuculina como bloqueador dos receptores GABA em lagostins (*Estacus armatus*) e em gatos (CURTIS, D.R.; DUGGAN, 1970). A aplicação de Bicuculina produziu convulsões agudas focais em ratos e diferente do que é observado com a Penicilina, por exemplo, os efeitos não mudam de acordo com a dose administrada, ainda que a indução de SE seja dose-dependente (SHINOZAKI; KONISHI, 1970b).

Toxina tetânica: é uma toxina sintetizada pelo bacilo *Clostridium tetani* que foi utilizada pela primeira vez para criar modelos de epilepsia em 1962 (CARREA;

LANARI, 1962). Os efeitos causados dependem da dose e podem ser observados até nove meses depois da aplicação, e estão relacionados principalmente a crises de ausência – mas também podem se manifestar com movimentos mioclônicos (SHINOZAKI; KONISHI, 1970b).

1.4.2 Estimulação elétrica

Choques elétricos: dentro dos modelos de convulsões por estimulação elétrica, esses são os modelos mais estudados. Eletrodos são posicionados nas orelhas ou nos olhos dos animais, os estímulos são estabelecidos de acordo com a espécie a ser estimulada (6Hz em camundongos e 50-60Hz em ratos). Estímulos de baixa intensidade geram convulsões tônicas, e geralmente tem baixo envolvimento comportamental dos indivíduos, entretanto as convulsões podem se intensificar caso os estímulos sejam aumentados, gerando convulsões tônico-clônicas. A indução de convulsões nesses modelos é utilizada para o estudo de drogas anticonvulsivantes e as alterações fisiológicas e moleculares (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014).

Abrasamento / "kindling": esse tipo de modelo é gerado quando, depois de 90-100 induções por estímulos elétricos (como o modelo descrito anteriormente) a área estimulada aumenta o seu potencial de suscetibilidade a convulsões, gerando convulsões parciais que podem evoluir para crises espontâneas. Conforme as convulsões se tornam mais frequentes elas se tornam clinicamente piores, o que mimetiza fielmente as alterações celulares e moleculares do que acontece em humanos e, portanto, o torna um modelo importante para estudar como ocorre a evolução da doença (KANDRATAVICIUS et al., 2014). O Glutamato estimula receptores alpha amino-2,3-dihydroisoxazolepropanoic-5-methyl-3-oxo-4 acid (AMPA), mas a sua ação de despolarização é imediatamente reduzida pela ação gerada nos receptores GABAA. A ativação dos receptores de AMPA inicia reações que levam a alterações nas ações do GABA e do glutamato, e com o decorrer do processo "kindling" o GABA deixa de exercer seu papel de inibidor de convulsões, tornando-as assim mais frequentes. Com o desenvolvimento desse modelo foi possível observar que algumas áreas são mais suscetíveis a convulsões generalizadas do que outras, portanto, necessitam de menos estímulos do que outras para induzir convulsões. Entre as suas limitações estão o alto custo financeiro e de tempo para que seja estabelecido o modelo (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014).

1.4.3 Outros modelos

Hipertermia: convulsões geradas por febre são comuns em crianças com menos de 5 anos – prevalência de 2 a 5%. O estudo desse tipo de convulsão mostra que somente um pequeno grupo de pacientes apresenta sequelas diretamente ligadas a ocorrência delas, quando analisamos os pacientes adultos com histórico de epilepsia as convulsões por febre estão presentes de 20 a 60% dos casos (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014). A técnica utilizada para mimetizar essas convulsões ocorre com o aquecimento da temperatura corporal de filhotes de camundongos e ratos à 40-42°C, o que estimula a ocorrência de convulsões. Filhotes submetidos a essa técnica apresentam convulsões espontâneas durante a idade adulta, e esse modelo é utilizado para verificar a perda neuronal e a predisposição ao surgimento dessas crises, entretanto diferente do que acontece em humanos – que as crises ocorrem causadas por febre – esse modelo que as crises são induzidas por hipertermia causada por calor externo podem implicar mecanismos diferentes dos que os que são en volvidos na ocorrência de convulsões causadas por hipertermia em humanos (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014; VAN GASSEN *et al.*, 2008).

Hipoxia neonatal: como no modelo de hipertermia, o protocolo utilizado para obtenção do modelo de convulsões por hipóxia depende da idade do modelo – filhotes de ratos com idade entre 10 e 12 dias expostos ao modelo de hipóxia global (7 a 4% O₂ por 15 minutos em câmara de gás) desenvolvem convulsões espontâneas na vida adulta - diferente de quando animais mais velhos (60 dias) ou mais jovens (5 dias) são submetidos a esse protocolo. Animais submetidos a esse protocolo apresentam também crescimento das fibras musgosas³ e alterações comportamentais como déficits sociais, de memória e aumento da agressividade (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014).

Epilepsia pós-traumática: esse tipo de crise epiléptica corresponde a 20% das crises sintomáticas que acontecem em pacientes humanos, sendo o trauma crânio

³ Fibras musgosas: se originam no tronco cerebral a na medula e se conectam às células de Purkinje, no cerebelo.

encefálico o maior responsável por elas. Esse tipo de trauma pode ocorrer de diversas formas em humanos, o que dificulta que seja mimetizado em modelos animais, entretanto o modelo animal que mimetiza essa condição em humanos é o de lesão por injeção de fluido, mas não é possível estabelecer quais seriam os mecanismos de como essa lesão ocorre em humanos (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014).

1.4.4 Predisposição Genética

A predisposição genética normalmente está relacionada a crises epilépticas reflexas, que fazem parte do diagnóstico de epilepsia, uma vez que são consideradas predisposições anormais, no caso, ligadas à condições genéticas (FISHER *et al.*, 2014).

Convulsões Fotogênicas:

Em 1972 Naquet e Meldrun⁴ descreveram uma população de Babuínos (*Papio papio*) que apresentam crises epilépticas de origem fotogênica, são convulsões tônicoclônicas que acontecem quando os animais são expostos à luz estroboscópica (SHINOZAKI; KONISHI, 1970b). Estudar esses animais permitiu entender que drogas que interferem no funcionamento das sinapses do sistema GABAérgico estimulam a fotosensitividade, enquanto as que estimulam o sistema GABAérgico tem efeito anticonvulsivante (SHINOZAKI; KONISHI, 1970b).

Convulsões audiogênicas:

Algumas linhagens de ratos e camundongos - não consideradas predispostas a convulsões audiogênicas - nascem com importante suscetibilidade a desenvolver essas convulsões. Essas linhagens podem se tornar sujeitas a convulsões na idade adulta se estimuladas com estímulos sonoros durante o período considerado crítico do seu desenvolvimento – processo denominado "*priming*". Existem também linhagens que são geneticamente pré-dispostas a convulsões de origem audiogênica - animais que necessitam apenas um estímulo sonoro para que seja iniciada uma convulsão reflexa – similar ao que acontece em humanos (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014; ROSS; COLEMAN, 2000). Entretanto alguns autores acreditam que modelos como os de linhagens predispostas a convulsões audiogênicas não são bons modelos para mimetizar crises epilépticas de humanos uma vez que crises geradas por um único

⁴ Naquet, R.; Meldrum, B.S. Photogenic Seizures in Baboon, Experimental Models of Epilepsy-A Manual for the Laboratory Worker. Raven Press, New York, 1972, pp. 373-406.

estímulo em humanos são praticamente inexistentes; normalmente elas têm origem genética e são desencadeadas com sons complexos ou associações de sons, envolvendo muitos outros fatores, entre eles envolvendo memória e cognição, e os modelos animais aparentemente necessitam de um único estímulo para desencadear a crise (GARCIA-CAIRASCO; UMEOKA; CORTES DE OLIVEIRA, 2017).

Alguns desses modelos são:

Ratos Krushinsky-Molodkina: a partir de 1947 Krushinsky e alguns colaboradores, no laboratório de I.P. Pavlov, na Rússia selecionaram ratos Wistar que respondiam com convulsões a um determinado estímulo sonoro⁵; convulsões que mais tarde foram caracterizadas como tônico-clônicas (POLETAEVA *et al.*, 2017).

GEPR: em 1979 Consroe⁶ e colaboradores (apud (FAINGOLD, 1988) descreveram uma variação de ratos Sprague-Dawley que eram naturalmente susceptíveis a crises epilépticas de origem audiogênica, na Universidade do Arizona. Esses ratos são uma importante ferramenta de crises de origem genética em humanos, e utilizados como modelos de crises tônico-clônicas e de crises parciais focais (FAINGOLD, 1988).

P77PMC: em 1977, uma variação da colônia de ratos Wistar da Faculdade de Medicina de Beijing, na China, apresentou uma predisposição genética a crises epiléticas tônico-clônicas de origem audiogênica – com incidência em mais de 70% dos animais (ZHAO *et al.*, 1985). Xi-Ru e Peng-Xin (1992) estudaram que a presença do CCK8 aumenta a liberação de GABA, que é o principal inibidor de convulsões, assim, a aplicação de CCK8 acaba por ser indiretamente um inibidor de convulsões.

Wistar Audiogenic Rat: no início da década de 1980 a caracterização de ratos Wistar susceptíveis a convulsões audiogênicas, nascidos no biotério da Escola de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, foi feita por Garcia-Cairasco como dissertação de mestrado⁷, e a primeira publicação foi feita

⁵ Os primeiros animais que foram observados tendo essas crises reagiram ao som de um estudo que não foi publicado, logo não é possível determinar precisamente como era o som, mas na referência ele foi citado como "acoustic bell".

⁶ Consroe P., Picchioni A. and Chin L. (1979) Audiogenic seizure susceptible rats. Fedn. Proc. 38, 2411-2416.

⁷ Garcia-Cairasco N, Sabbatini RM. Role of the substantia nigra in audiogenic seizures: a neuroethological analysis in the rat. Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas. 1983 Jul;16(2):171-183. PMID: 6686072.

pelo mesmo autor em 1983 (apud (GARCIA-CAIRASCO; UMEOKA; CORTES DE OLIVEIRA, 2017). Diversas formas de avaliação das crises epilépticas foram geradas para estudar e caracterizar o modelo que hoje serve para estudar convulsões tônicoclônicas de forma aguda e crises geradas no sistema límbico, de forma crônica (GARCIA-CAIRASCO; UMEOKA; CORTES DE OLIVEIRA, 2017).

Hamsters:

GASH:Sal: em 1987 Soria⁸ e colaboradores descreveram hamsters (*Mesocricetus auratus*) que eram geneticamente predispostos à crises audiogênicas, denominados GPG:Vall (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2017; MUÑOZ *et al.*, 2017). Esses animais apresentavam convulsões tônico-clônicas de origem no tronco encefálico quando submetidos a estímulos sonoros de 1-20kHz de intensidade de 60 a 80dB. Alguns desses animais foram levados para a Universidade de Salamanca, onde foram cruzados com hamsters sem a mutação, resultando na linhagem denominada hoje como GASH:Sal (Genetic Audiogenic Seizure Hamster, Salamanca). A linhagem original com o passar do tempo passou a apresentar animais com baixa fertilidade e hoje está extinta (MUÑOZ *et al.*, 2017).

A linhagem GASH:Sal vem sendo utilizada para estudar alguns tipos de crise epiléptica que ocorrem em humanos, como as mioclônicas que ocorrem em crianças ou as tônico-clônicas que ocorrem em adultos (MUÑOZ *et al.*, 2017).

Camundongos:

DBA: camundongos da linhagem DBA são susceptíveis a convulsões de origem audiogênica do 14º ao 42º dia pós nascimento (PN). Os animais apresentam convulsões clônicas, que evoluem para convulsões tônicas e normalmente levam à morte do animal (NEUMANN; COLLINS, 1991).

BUB e Frings: ambas linhagens de camundongos são portadoras da mutação do gene Mass1^{frings}, que é o gene correspondente ao gene responsável pela susceptibilidade a convulsões audiogênicas em humanos, são também utilizadas como modelo da Sindrome de Usher (tipo IIC – USH2C), caracterizada pela perda de audição neurossensorial (JOHNSON *et al.*, 2005).

⁸ Soria MA, Macias JA, Aguirre A, Gómez P, Gómez ME. Epilepsia audiógena en una cepa endogámica de hámster dorado (Mesocricetus auratus). Rev Esp Epilepsia 1987;2(1):27–33.

O estudo de modelos geneticamente predispostos a crises epiléticas mostrou que testes de comportamento ajudam a caracterizar comorbidades associadas à epilepsia, uma vez que os modelos apresentam condições semelhantes às que são verificadas em pacientes humanos. Por exemplo, ratos WAR que apresentam respostas similares às de ansiedade, ou ratos WAG/Rij que apresentam respostas similares às de depressão quando testados, ambas condições que mimetizam a condição de pacientes humanos (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014).

1.5 NEUROINFLAMAÇÃO

Como discutido anteriormente, as crises epilépticas podem ter diferentes causas, entre elas inflamações do SNC - causadas por danos teciduais, acidentes vasculares ou infecções – mas uma parte importante dessas crises são geradas por aumento das neuroinflamações, uma vez que estas podem aumentar a hiperexcitabilidade do SNC, o que é seguido de um risco aumentado da ocorrência de crises epilépticas (SOLTANI KHABOUSHAN; YAZDANPANAH; REZAEI, 2022).

O termo neuroinflamação é utilizado para caracterizar inflamações que ocorrem no SNC e assim diferenciá-las das que ocorrem em áreas periféricas. A barreira hematoencefálica (BHE) - consiste em um conjunto de células endoteliais, associadas aos capilares no SNC que é responsável por impedir ou dificultar a entrada de substâncias provenientes da circulação periférica (por exemplo determinados medicamentos ou substâncias tóxicas), entretanto ela é permeável a citocinas próinflamatórios (LYMAN *et al.*, 2014; VIEIRA; SOUSA, 2013). Neuroinflamações são basicamente respostas imunes que podem se tornar danosas ao tecido quando exacerbadas (SOLTANI KHABOUSHAN; YAZDANPANAH; REZAEI, 2022).

Inflamações periféricas produzem citocinas pró-inflamatórias, que tem sua ação dependente da área ou da situação em que são liberadas. A princípio imaginava-se que as citocinas pró-inflamatórias seriam muito grandes para atravessar a BHE, entretanto estudos recentes mostraram a existência de sistemas de transporte transmembrana que facilitam a passagem de algumas dessas citocinas, principalmente de fator de necrose tumoral (TNF - *tumor necrosis factor*) e interleucina (IL)-6 para o SNC. A passagem dessas citocinas acaba por alterar a permeabilidade da BHE, gerando um efeito bola de neve fazendo com que cada vez mais citocinas atravessem esta barreira (LYMAN *et al.*, 2014).

O principal tipo de células ativadas na neuroinflamação é a micróglia, que são os macrófagos residentes do SNC, que em casos de inflamações crônicas são ativadas por um longo período liberando citocinas e outras moléculas neurotóxicas, o que contribui para a neurodegeneração a longo prazo. Juntamente com a micróglia, os astrócitos são responsáveis pela ativação de alguns tipos de receptores TLR⁹ – que são proteínas transmembranas importantes para ativação do sistema imune, uma vez que reconhecem patógenos invasores (LEE; LEE, 2002); e a ativação do TLR-4 por sua vez induz a liberação de TNF- α e interleucina 1beta (interleukin 1beta - IL-1 β), além de ser um dos principais receptores da sinalização pró-inflamatória (LYMAN *et al.*, 2014).

1.5.1 Neuroinflamação e epilepsia

Os primeiros estudos que relacionaram o surgimento de crises epiléticas à neuroinflamação observaram a super expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-6, nos astrócitos de camundongos que apresentavam convulsões espontâneas, além dessas as mais comumente estudadas são IL-1β, CCL2 e CCL3 uma vez diversos estudos já observaram níveis aumentados dessas citocinas após ocorrência de convulsões (LI *et al.*, 2011; VEZZANI; FRIEDMAN, 2011).

O TNF-α é uma citocina que apresenta fortes características pró-inflamatórias e está envolvido na regulação das respostas imunes e é responsável pela ativação de dois receptores – p55 e p75 – que estão respectivamente relacionados à ativação da morte celular programada e à ativação do sistema do fator nuclear Kappa B (NF-kB) que é responsável por alguns fatores de transcrição do DNA. A presença de TNF-α aumenta a permeabilidade da BHE, fazendo com que a passagem de citocinas neuroinflamatórias para o SNC seja facilitada, e assim aumentando a ocorrência de crises epilépticas (LI *et al.*, 2011; SOLTANI KHABOUSHAN; YAZDANPANAH; REZAEI, 2022).

Citocinas do tipo IL-1 em geral são expressas em níveis baixos no SNC de humanos e normalmente o aumento da sua expressão estão relacionados a neuroinflamações (LI *et al.*, 2011). Ravizza e colaboradores (2008) demonstraram que essa citocina pode ser usada como marcadora de neuroinflamação uma vez que ela

⁹ Denominados assim por serem homólogos aos Toll-receptors, observados inicialmente em Drosophila.

sofre aumento pós convulsão e isso acarreta também no aumento da atividade epiléptica e na diminuição do limiar para ocorrência de uma convulsão futura. Animais que foram submetidos a convulsão por protocolo de indução por injeção de pilocarpina tiveram elevados níveis de IL-1β no hipocampo, e em outras áreas, até 24 horas após a convulsão, mas os níveis voltaram ao normal 5 dias após a convulsão (ARISI *et al.*, 2015), o que indica que a recuperação em relação ao aumento dos níveis dessa citocina no SNC acontece antes desse período. Li e colaboradores observaram que IL-1β aumenta a excitabilidade neuronal, uma vez que ele inibe os receptores GABAA (2011).

Pela primeira vez em 1998 Peltola e colaboradores reportaram níveis elevados de IL-6 no fluido cérebro espinhal de pacientes que passaram por convulsões recentes (<72h) quando comparados com pacientes hígidos (PELTOLA *et al.*, 1998), e em 2011, Li e colaboradores observaram altos níveis de IL-6 mRNA no hipocampo e em outras áreas, também em comparação aos animais controle (LI *et al.*, 2011), e entenderam esse aumento como um efeito neurotóxico e pro-convulsivo dessa proteína no SNC. Outros estudos indicaram também o IL-6 como importante para a formação do SNC – camundongos *knockout* de IL-6 apresentaram menor quantidade de células progenitoras no giro denteado e nas camadas subventriculares quando comparados a camundongos com quantidades normais dessa citocina (BOWEN; DEMPSEY; VEMUGANTI, 2011).

Quanto a expressão de CCL2, essa citocina normalmente está relacionada à resposta imune, ela é produzida após a ativação de receptores de reconhecimento padrão, e junto com a CCL3 é classificada como quimiocina inflamatória (PALOMINO; MARTI, 2015). Arisi e colaboradores (2015) observaram níveis elevados de CCL2 e CCL3 no hipocampo de ratos submetidos à *status epileticus* por injeção de pilocarpina a partir de 2 horas após a indução, com aumento observado até 24 horas depois da crise, e níveis mais baixos mas ainda aumentados 5 dias após a crise, e discutem que outros autores observaram o mesmo resultados em outros modelos de indução, e que possivelmente estas a CCL2 estão envolvidas com o comprometimento da sobrevivência de neurônios em estruturas relacionadas com o surgimento de crises epilépticas com o que indica que estas quimiocinas estão relacionadas com a ocorrência de crises epilépticas.

Essa tese será apresentada em formato de coletânea de artigos, sendo que o primeiro já foi publicado na revista Epilepsy & Behavior em Abril de 2020, e o segundo foi submetido à publicação na mesma revista, no dia 1 de julho de 2022.

O primeiro artigo apresenta resultados que foram obtidos durante o mestrado, como os testes que analisam o desenvolvimento físico e de reflexos dos camundongos e parâmetros analisados em testes comportamentais, como atividade geral em campo aberto, memória espacial em labirinto em T, coordenação motora em trave elevada e de nado forçado e suspensão pela cauda (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

Dos resultados apresentados no primeiro artigo: durante o doutorado foram realizados o mapeamento genético e o sequenciamento por método Sanger do gene Egr3, a quantificação da expressão gênica dos genes Egr3 e Gabra1 no hipocampo em comparação com animais WT, assim como a quantificação dos neurotransmissores e seus respectivos metabólitos, e também a caracterização comportamental dos camundongos *tremor* quando submetidos a convulsão induzida por estímulo sonoro.

O segundo artigo mediu também a quantificação da expressão dos genes Egr3, Gabra 1 e 4 camundongos *tremor*, entretanto essa quantificação foi realizada em camundongos *tremor* 30 minutos após estes terem sido submetidos a crise epiléptica induzida por estímulo sonoro e comparada com camundongos *tremor* não submetidos a convulsão induzida por estímulo sonoro (*naive*).
2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar os camundongos mutantes *tremor* como modelo espontâneo de convulsão audiogênica, e para tanto:

• Avaliar características comportamentais durante as convulsões dos camundongos *tremor*.

• Realizar o mapeamento genético e o sequenciamento do gene candidato de camundongos *tremor* em fundo genético C57BL/6J.

• Quantificar neurotransmissores GABA, GLU, GLY, ASP no hipocampo de camundongos *tremor* em comparação a camundongos Controle – (Wild Type - WT).

• Quantificar neurotransmissores DA, NOR e 5-HT e seus metabólitos VMA, DOPAC, HVA e 5-HIAA no hipocampo de camundongos *tremor* em comparação a camundongos WT.

 Quantificar a expressão dos genes Egr3 e Gabra1 no hipocampo de camundongos *tremor* em fundo genético C57BL/6J em comparação a camundongos WT.

 Quantificar a expressão de mRNA de Egr3, Gabra1 e 4 no hipocampo de camundongos *tremor* após convulsão induzida por estímulo sonoro em comparação aos camundongos *naive*.

 Quantificar por RT-qPCR a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Tnf-α, II1-β, II-6, Ccl2 e Ccl3) no hipocampo de camundongos *tremor* após crise epiléptica induzida por estímulo sonoro e comparar com a dos animais *tremor* naive (que não passaram por convulsão induzida por estímulo sonoro).

3 CAPÍTULO 1 - Behavioral and neurochemical characterization of the spontaneous mutation *tremor*, a new mouse model of audiogenic seizures

Esse artigo foi publicado na revista Epilepsy & Behavior, em abril de 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.106945

Sendo o autor do artigo, a revista dá o direito de que este seja utilizado em uma tese ou dissertação.¹⁰

Behavioral and neurochemical characterization of the spontaneous mutation *tremor*, a new mouse model of audiogenic seizures

Mariana de Souza Aranha Garcia-Gomes; Dennis Albert Zanatto; Orfa Yineth Galvis-Alonso; Jorge Mejia; Ana Tada Fonseca Brasil Antiorio; Pedro Kenzo Yamamoto; Márcia Carolina Millán Olivato; Thaísa Meira Sandini; Jorge Camilo Flório; Ivo Lebrun; Silvia Maria Gomes Massironi; Sandra Regina Alexandre-Ribeiro; Maria Martha Bernardi; Susan Ienne; de Souza, Tiago Antonio; Maria Lúcia Zaidan Dagli; Claudia Madalena Cabrera Mori

HIGHLIGHTS

• Audiogenic seizures of tremor mice are associated to progressive motor impairment and hippocampal overexpression of Egr3 gene.

• Mutant tremor showed raised levels of NOR, 5HT, 5-HIAA, GABA, glutamate and aspartate in hippocampus.

• Mutant tremor could be useful for study neurotransmission pathways as modulator of epilepsy.

¹⁰ Para mais informações acessar: https://www.elsevier.com/about/policies/copyright#Author-rights

ABSTRACT

The *tremor* mutant phenotype results from an autosomal recessive spontaneous mutation arisen in a Swiss-Webster mouse colony. The mutant mice displayed normal development until three weeks of age when they began to present motor impairment comprised by whole body tremor, ataxia and decreased exploratory behavior. These features increased in severity with aging suggesting a neurodegenerative profile. In parallel, they showed audiogenic generalized clonic seizures. Results from genetic mapping identified the mutation tremor on chromosome 14, in an interval of 5 cM between D14Mit37 (33.21 cM) and D14Mit115 (38.21 cM), making Egr3 (Early Growth Response 3) the main candidate gene. Comparing with wild type (WT) mice, the *tremor* mice showed higher hippocampal gene expression of Egr3 and Gabra1 and increased concentrations of noradrenalin (NOR; p=0.0012), serotonin (5HT; p=0.0083), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA; p=0.0032), γ-amino butyric acid (GABA; p=0.0123), glutamate (p=0.0217) and aspartate (p=0.0124). In opposition, the content of glycine (p=0.0168) and the vanillylmandelic acid (VMA)/NOR ratio (p=0.032) were decreased. Regarding to dopaminergic system, neither dopamine (DA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) contents nor the turnover rate of DA showed statistically significant differences between WT and mutant mice. Data demonstrated that audiogenic seizures of *tremor* mice are associated to progressive motor impairment as well as to hippocampal alterations of the Egr3 and Gabra1 gene expression and amino acid and monoamine content. In addition, the tremor mice could be useful for study of neurotransmission pathways as modulators of epilepsy and the pathogenesis of epilepsies occurring with generalized clonic seizures.

KEYWORDS: hippocampus, reflex seizure, genetic epilepsy, neurotransmitters, behavioral phenotype

3.1 INTRODUCTION

Epilepsy is a disease characterized by presenting one of the following conditions: at least two unprovoked (or reflex) seizures occurring more than 24 hours apart; one unprovoked (or reflex) seizure with a 10-year period risk of further seizures comparable to the one of patients who have had two unprovoked seizures (at least 60%); or a diagnosis of an epilepsy syndrome [1]. Nearly 50 million people worldwide display epilepsy, and the risk of premature death in people with this disease is up to three times higher than for the general population, obtained from WHO - World Health Organizaton (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy).

At least 81 different epileptic syndromes in humans have a confirmed causal mutation and these mutated genes have been characterized over the years, but their functions have not been fully described yet, requiring more detailed studies using animal models [2]. A great variety of animal models, including spontaneous mutants, can be used to study epilepsy syndromes. It is predicted, however, that more than a thousand different genes may be related to genetic epilepsy etiology [3,4]. Many animal species, such as mice, gerbils, rats, chickens, dogs and nonhuman primates, have been described as good models for epilepsy. In spite of that, mouse and rat models developed by genetic selection are the most used species to study epilepsy [2].

Within genetic models of epilepsy, susceptibility to generalized tonic-clonic seizures induced by sound (named audiogenic seizures) is frequent and is associated to complex and pathological alterations of synaptic activity mediated by GABA, glutamate, dopamine, noradrenalin and serotonin [5–7]. Additionally, studies carried out with strains such as Wistar Audiogenic Rats (WAR) and Genetic Audiogenic Seizure Hamsters (GASH:Sal), for instance, suggest that genes of the Early Growth Response (EGR) family play an important role in mechanisms involved in audiogenic seizure development [8].

Despite the achievement of model development by genetic engineering, spontaneous mutations are still valuable for understanding new functions and structures of genes, considering that their associated phenotype could be similar to the one caused by natural mutations in human genome [9]. Spontaneous mutations seem to occur randomly and in a low frequency in most genes. In laboratory mouse, average occurrence of spontaneous mutations varies from 5×10^{-6} to 10^{-7} in dominant genes and from 5×10^{-6} to 10^{-5} in recessive ones [10].

The spontaneous mutation *tremor* was identified in the Swiss-Webster mouse colony of the laboratory animal facility of the Department of Pathology of the School of Veterinary Medicine and Animal Science at University of São Paulo, Brazil (FMVZ-USP). Around three weeks of age, some mice in a litter showed tremors, ataxia, motor incoordination and audiogenic seizures; therefore, they were labeled *tremor* (*tr*). These individuals were selected for further studies, which identified the mutation as an autosomal recessive inheritance pattern (Unpublished results).

In order to characterize the spontaneous mutation *tremor* in the present study, a sequence of tests was performed to evaluate post-natal development, behavioral features of seizures, general activity, motor coordination, exploratory behavior, spatial memory, and coping behavior. Additionally, Egr3 and Gabra1 gene expression, neurotransmitter monoamine and amino acid levels were measured in hippocampus.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Mice

Mice were bred at the Department of Pathology, FMVZ-USP, Brazil. Animals were housed in individually ventilated cages (Alesco Indústria e Comércio, Monte Mor, Brazil) with pine shavings for bedding, under controlled room temperature of 22 \pm 2°C, with an air relative humidity of 45-65%. They had unrestricted access to filtered and autoclaved water and to irradiated commercial diet formulated according to the AIN-93M formulation (Nuvilab, Quimtia, Paraná, Brazil). Room was kept on a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 07:00 am) at artificial light. A description of the animals used in each experiment and the number of animals per experimental group are presented in Table 1.

3.2.2 Ethics statement

The Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA/FMVZ/USP) approved the research protocols under number 4124150116 and 4864190717, and all procedures were carried out in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the US National Research Council [11]. The experiments were performed under proper laboratory practice protocols and following quality assurance methods. All efforts were made to minimize animal suffering.

3.2.3 Genetic mapping and candidate gene sequencing

Congenic mutant males on a C57BL/6J background were outcrossed with BALB/cJ females. F1 heterozygous mice were bred to produce F2 offspring that were WT (25%), heterozygous (50%) and homozygous (25%) for the mutation; the latter were selected by phenotype and used for microsatellite mapping. Genomic DNA was extracted from tail biopsy. Mapping the location of crossovers in these progenies provided information on the recombination events arising in the F2 mutant. Initially, 11 mutant mice were genotyped using a broad panel of 31 polymorphic microsatellite markers showing different PCR products (size in base pairs) between BALB/cJ and C57BL/6J, selected on each autosome. A linkage on chromosome 14 was observed and 16 additional microsatellite markers were selected, analyzing 78 F2 mutants to establish a candidate region. The genetic positions of markers in centimorgans and the corresponding primer sequences were obtained from the online databases MGI – Mouse Genome Informatics (www.informatics.jax.org – The Jackson Laboratory) and Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org).

Search for functional candidate genes was done based on animal models with similar phenotype reported on databases MGI (Mouse Genomic Informatics) and Ensembl Genome Browser, suggesting Egr3 gene as the main candidate for the mutation. Genomic DNA was used to sequencing Egr3 exons by Sanger method [12]. Sequence analysis was performed on genomic DNA in 2 mutants and 2 WT mice on a C57BL/6J background using primers designed to amplify the two protein-coding variants of Egr3 gene: Egr3-204 (2 exons, 3940 bp and 387 a.a.) and Egr3-201 (3 exons, 1509 bp and 349 a.a.). The primer sequences are listed in supplementary Table 1 (S1).

3.2.4 Egr3 and Gabra1 gene expression

The gene expression of Egr3 and Gabra1 was analyzed in the hippocampus of C57BL/6J mutant and WT mice by RT-qPCR. Briefly, 6 mutant and 6 WT naïve mice (do not submitted to acoustic stimuli) were euthanized by overdose of sevoflurane, and the brains were removed from the skull for dissection of hippocampus as described previously [13].

Total RNA was isolated and purified using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit and RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's protocols. The RNA extracts were first analyzed by Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). RNA quality was determined by the A260/A280 (close to 2) and A260/A230 (close to 2) ratios, and qualified RNA samples were tested using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). RNAs with 28S/18S RNA ratio between 7 and 8 were used for gene expression.

Reverse transcription reactions were carried out with random primers and SuperScript-II reverse transcriptase (Life Technologies Corporation, USA). cDNA for RT-qPCR was prepared from 2µg of total RNA in 20µl reactions. Egr3 and Gabra1 gene expression was analyzed using Taqman® Gene Expression assays Mm00516979_m1 and Mm00439046_m1, respectively (Life Technologies Corporation, CA, USA), performed on the StepOnePlus[™] system (Applied Biosystems). 18S rRNA (Hs03003631_g1; Life Technologies Corporation, CA, USA) was used as reference gene. Data for each target gene were normalized to the endogenous reference gene, and the fold change in target gene expression was calculated using the 2^{-ΔΔCt} method [14].

3.2.5 Evaluation of postnatal development

Mutant males were crossed with Swiss-Webster females to produce heterozygous F1 progeny. Ten F1 females were crossed with homozygous mutant males to produce offspring that were 50% heterozygous and 50% homozygous for mutation. Thus, 34 homozygous mutant and 34 heterozygous littermate WT mice were tested.

Developmental tests adapted from the literature were used to characterize early markers of the mutant mice phenotype [15,16]. The physical development evaluation was done from birth to three weeks and included pinnae detachment, eye opening, lower and upper incisor eruption, fur development, and body weight and length.

A sequence of behavioral tests was chosen to assess developmental reflexology. The surface righting reflex is defined as the motor ability for a mouse pup to turn over from a supine position. Briefly, the pup was placed gently onto its back and hold in this position for 5 sec. The time that the pup takes to return to prone position after release was recorded. Three trials were done for each pup in which a maximum time of 60 sec was given for each trial.

The negative geotaxis test assesses motor coordination in young mice. Pups are placed on a 45-degree-inclined plane with the head facing downwards and, due to vestibular cues of gravity, they can turn to face up the slope. The response to stimulus, or taxis, is an innate behavior. The latency period that the pup takes to change its position was recorded, up to a maximum of 60 sec [16,17].

The grasping reflex is a motor test in which the pup fore or hind foot is stroked with a rounded side blunt instrument; thus, the hand or foot is flexed to grasp the instrument. To perform the test, mouse pups were gently held by the scruff of their neck and fore paws were stroked with a metal paperclip [16]. The presence or absence of grasping was registered.

The startle response test was performed in a room with low level of environmental noise. Mice were exposed to acoustic stimuli by finger snapping at 25 to 30 cm above each pup. A sudden extension of the head and fore and hind limbs should be observed immediately after the acoustic stimuli [16]. The presence or absence of response was registered.

3.2.6 Behavioral phenotyping

The mutant phenotype was assessed by behavior tests as described by Manes et al. [18] with modifications. Testing was performed in a small room with dim lighting. The apparatuses were cleaned with a 5% alcohol/water solution before each animal was placed to prevent possible bias caused by odor cues left by the previous one. All procedures were video-recorded for offline visual evaluation by two experienced observers. In addition, Ethovision XT video tracking system (Noldus Information Technology by, 7.1.426, The Netherlands) was used for data analyses of distance traveled (cm) and speed (cm/s) in the open field test (OFT) [19].

OFT was used to evaluate exploratory behavior and total locomotor activity levels measuring distance traveled and average speed, and the frequencies of rearing and grooming, as described elsewhere [20]. Testing was performed for five minutes with mutant and WT mice at three and eight weeks of age.

T-maze alternation test is based on the natural proclivity of rodents to alternate between the visited goal-arms in each trial over a series of successive trials, and is very sensitive to assess hippocampal dysfunction [21]. The test was performed to evaluate spatial memory of mutant and WT mice at 9 weeks of age following the protocol previously described [18]. Briefly, mouse was placed in the start area of the apparatus for 10 sec. At this point, the barrier was raised, and the mouse was permitted to explore the maze for up to 30 sec. Once the mouse entered one of the free choice arms, the barrier was inserted to block the animal inside that arm for 30 sec. Thereafter, the mouse was repositioned in the start area, initiating another session. If the mouse did not enter in any of the free choice arms after 30 sec, it was replaced in the start area, and the session, the sequence of entries in the free choice arms was evaluated, i.e., whether the mouse first entered in left or right arm. For statistical analysis, data were transformed into scores: 0 = no alternations; 1 = one alternation; 2 = two alternations; 3 = three alternations; and 4 = four alternations.

Motor coordination was assessed in mutant and WT mice at three and eight weeks of age by the balance beam task, as described previously [18]. In brief, the apparatus consisted of a wooden beam with 1.5 cm wide and 150 cm long supported on the floor by two platforms of 20 cm at each end. At the starting end, a light was used as an aversive stimulus; and at the opposite end, a dark box was placed as a shelter and positive stimulus for mice to cross the beam. During the first and second days of training, each mouse was placed on the starting end and it should walk across the beam from one end to the other for three times. Each mouse underwent three sessions of five minutes. The test was performed on third day, when mice were placed on the starting platform and had to cross the bar. For statistical analysis, data were transformed into scores as follows: 1- the mouse does not cross the beam; 3- the mouse crosses the beam with errors; 7- the mouse crosses the beam without errors. Besides, time taken to cross the beam and number of falls were recorded.

Forced swim test (FST) and tail suspension test (TST) have been used to assess coping behavior and motor function of mutant mice [18,22], and were performed with mutant and WT mice between 9 and 10 weeks of age. FST was performed as described previously [23]. Shortly, each mouse was individually placed into a vertical glass cylinder with 22 cm in diameter containing water with a depth of 25 cm and temperature of 23-25°C. After 6 min in the cylinder, animals were removed, dried, and moved to a warm cage. TST was performed as described [18,24]. In brief, a tape attached to a hook was used to suspend mice by the tail in a single 6-min trial shot with a camera in front of the apparatus. Immobility time was defined as the mouse not struggling. For both tests latency to immobility and total immobility time was recorded.

3.2.7 Response to acoustic stimuli

Forty mice (20 mutant and 20 WT littermates; 10 males and 10 females of each genotype, 10-12 weeks old) were used. The experimental apparatus consisted of a Plexiglas cylinder (22 cm in diameter, 30 cm in height) positioned 60 cm beside a 130-Watt ultrasonic processor (Sonic and Materials Inc.), with operating frequency of 20 kHz. During testing, each mouse was placed individually in the cylinder and allowed to explore for 15 sec. Then, the ultrasonic processor was turned on for 60 sec or until onset of convulsion. Animals were tested only once and the latency to onset of seizure was recorded. One week later, mice that had presented audiogenic seizures received diazepam (UNI-DIAZEPAX®, União Química Farmaceutica Nacional S/A, MG, Brazil) (0.5mg/kg, subcutaneously) and were submitted to acoustic stimuli 15 min after administration, in the same way as described above.

3.2.8 Measurement of CNS neurotransmitters and its metabolites

Mutant and WT male mice with 10 weeks of age were euthanized by decapitation and the hippocampus was dissected out and placed on an ice-cold plate. Each sample was quickly frozen and stored in an ultra-freezer at -80°C until assayed. The contents of noradrenaline (NOR), vanillylmandelic acid (VMA), dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), 5-hydroxytryptamine (5-HT), and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) were

determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) with a C-18 column and an electrochemical detector (Shimadzu, model 20A, Kyoto, Japan). DA, NOR, and 5-HT turnover (metabolite/neurotransmitter ratio) were calculated. The detection limit for monoamines was 2 pg, the coefficient of variation was less than 15%, and the curve linearity was greater than 0.9. The content of amino acids GABA, glutamate, glycine and aspartate were measured by HPLC (HP, model 1100) with a Beckman Ultrasphere ODS-PTH column and sample injector (valve for 1.0 ml), and the limit of detection was 20 pg [25].

3.2.9 Statistical analysis

Descriptive statistics was used to analyze gene expression. A two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test was employed to evaluate strain, age and sex effects on the physical and reflexology development, general activity, T-maze and balance beam task. Unpaired t test with Welch's correction was used to analyze the TST and FST parameters, and neurotransmitters and its metabolites in the CNS. Statistical analysis was completed with GraphPad Prism 8.2.1 software (GraphPad Software, Inc., 7825 Fay Avenue, Suite 230 La Jolla, CA 92037 USA). The data were expressed as the mean ± SEM or as or the medians and interquartile range, and results were considered significant at p<0.05.

3.3 RESULTS

3.3.1 Genetic mapping and candidate gene sequencing

The genome scan using polymorphic microsatellite markers distributed through the mouse genome showed that the mutation *tremor* is located on chromosome 14, in the interval of 5 cM between D14Mit37 (33.21cM) and D14Mit115 (38.21 cM), making Egr3 the main candidate mutant gene. According to the UCSC Genome Browser, Egr3 site has two protein-coding variants, Egr3-204 (2 exons) and Egr3-201 (3 exons). Genomic DNA of all coding regions was sequenced, and DNA sequences from mutant and WT mice on C57BL/6J background were matched using the Clustal application within the BioEdit version 7.2. No mutation was found in the analyzed DNA sequences.

3.3.2 Egr3 and Gabra1 receptor subunit gene expression

In the quantitative RT-qPCR analyses, descriptive statistics demonstrated higher gene expression of Egr3 (25% percentile 1.43; median 3.72; 75% percentile 5.50; mean 3.68 and SEM 0.98) and Gabra1 (25% percentile 1.36; median 1.70; 75% percentile 2.03; mean 1.67 and SEM 0.16) in mutant compared to WT mice (Fig 1).

3.3.3 Evaluation of postnatal development

The mutant mice did not differ from WT mice in physical and reflexology development from birth to three weeks of age (Fig 2a-d). After four weeks of age, a two-way ANOVA showed a significant effect of strain (F(3.28) = 52.56, p<0.0001) on weight, such that mutants weighed less than WT mice (Fig 2e). After three weeks of age, mutants can be easily distinguished from the WT mice by phenotypic characteristics as tremor, ataxia, motor incoordination and spontaneous seizures (S2. supplementary material - video 1).

3.3.4 Behavioral phenotyping

Effects of strain and age or sex on the distance traveled, average speed, grooming frequency and rearing frequency were evaluated using two-way ANOVA tests. For the first parameter, a significant main effect of strain was demonstrated on distance traveled (F[1, 32] = 15.13, p=0.0005) and average speed (F [1, 32] = 15.00, p=0.0005), such that mutant mice showed reduced parameters compared to WT mice (Fig. 3a and b). A significant main effect of age was also observed, indicating that eight weeks old mutant and WT mice traveled a longer distance (F[1, 32] = 28.19, p=0.0001) and showed a higher average speed (F[1, 32] = 28.93, p=0.0001) than mice with three weeks of age (Fig. 3a and b).

Relative to grooming frequency, a significant main effect of strain (F[1, 38] = 4.69, p=0.0366) was observed, according to which mutants showed increased frequency of grooming at three weeks of age and decreased frequency at eight weeks of age (Fig 3c) compared to WT animals. A main effect of age (F[1, 38] = 9.72, p=0.0035) and the interaction between age and strain (F[1, 38] = 17.74, p=0.0001)

were also demonstrated, showing that mutants at eight weeks of age present decreased grooming frequency when compared to mutants at three weeks of age (Fig 3c). In addition, a significant main effect of sex (F[1, 36] = 12.51, p=0.0011) at eight weeks was demonstrated, indicating that males presented decreased grooming frequency when compared to females (Fig 3d).

Regarding the rearing frequency, a significant main effect of strain (F[1, 38] = 21.92, p<0.0001) was demonstrated, in which mutants showed decreased frequency at three and eight weeks of age when compared to WT mice (Fig 3e). Additionally, a significant main effect of age by strain (F[1, 38] = 15.04, p=0.0004) and the interaction of age between strains (F[1, 38] = 4.61, p=0.0381) were also demonstrated, such that mutants presented decreased rearing frequency at eight weeks of age when compared to mutants at three weeks of age (Fig 3e). Finally, a significant main effect of sex (F[1, 36] = 19.24, p<0.0001) was also observed, according to which WT males presented decreased rearing frequency when compared to WT females (Fig 3f).

In the balance beam test, WT mice presented higher scores than mutants when crossing the bar (F[1, 28] = 504003, p<0.0001) (Fig 4a). No differences were observed between males and females. Mutant mice took a longer time to cross the bar (F[1, 32] = 55.96, p<0.0001) and had a greater number of falls (F[1, 34] = 13.69, p=0.0008) compared to the controls (Fig 4b and c). With a two-way ANOVA, a significant main effect of age and the interaction between strain and age (F[1, 34] = 7.70, p=0.0089) on the number of falls were observed, while mice were crossing the beam.

In the T maze alternation task, mutant and WT mice presented similar behavior, but males showed higher scores relative to females (F[1, 36] = 4.43, p= 0.0423) (Fig 4d).

Finally, in the FST and TST, the latencies for the first immobility of mutant and WT mice were not significantly different. The total immobility time of mutants was significantly higher than that of WT mice, in the FST (t=6.89, df=6.64, p=0.0003) as well as in the TST (t=6.68, df=13.73, p<0.0001) (Fig. 4e and f).

3.3.5 Response to acoustic stimuli

During acoustic stimulation, WT littermates of mutant mice displayed normal behavior with exploration and walking around the cylinder. In contrast, beginning between 1 and 2 sec after the stimulus onset, all female and 80% of male *tremor* mice showed monophasic wild running followed by jumping, atonic falling with generalized clonic seizures, sometimes with body rolling, for a period of nearly 40 sec. In the sequence, mice remained in ventral decubitus with occasional clonus and dyspnea for an additional interval of 90 to 120 sec. Finally, mice recovered walking and exploring behavior with similar features to that displayed in the basal prestimulus condition. Mutant mice treated with diazepam did not express audiogenic seizures after stimuli. A video recording of a representative seizure can be seen in supplementary material – S3 video 2.

3.3.6 Measurement of CNS neurotransmitters and its metabolites

Comparing mutants with WT mice, the hippocampal concentrations of GABA (t=2.52, df=14, p=0.0123), glutamate (t=2.22, df=14, p=0.0217), aspartate (t=2.51, df=14, p=0.0124), NOR (t=3.95, df=15.88, p=0.0012), 5-HT (t=2.97, df=17.66, p=0.0083) and 5HIAA (t=3.56, df=13.88, p=0.0032) were significantly increased. In contrast, VMA/NOR ratio (t=2.38, df=13.90, p=0.032) and glycine levels (t=2.36, df=14, p=0.0168) were decreased. Regarding to dopaminergic system, neither DA and DOPAC contents nor the turnover rate of DA (the DOPAC plus HVA to DA ratio) showed statistically significant differences between WT and mutant mice (Fig 5, Tab 2).

3.4 DISCUSSION

In the present study, *tremor* mice displayed audiogenic seizures with behavioral features similar to the ones detected in rodents such as dilute brown agouti coat color (DBA) mice [26], WAR [27] and GEPR rats [26], and GASH:Sal hamsters [28]. Seizures in *tremor* mice were associated to hippocampal alterations of Egr3 and Gabra1 gene expression, as well as of glycine, GABA, glutamate, aspartate, NOR, 5-HT and 5HIAA content, and VMA/NOR ratio. Then, taken all the

alterations together, tremor mice may be a useful tool for the study of epilepsy.

The prevailing phenotype of the spontaneous mutant *tremor*, that enable to distinguish from WT mice after three weeks old, is a constant tremor while moving even when in home cage. WT mice moved quickly in the cage while mutant mice were stalled and showed ataxia and full-body tremor when stimulated on that purpose. With aging, tremor phenotype intensifies and motor coordination decreases, while generalized clonic audiogenic seizures are observed. Initial observations showed that both sexes were fertile; females, however, presented inferior fertility compared to WT mice. Heterozygous animals were indistinguishable from Swiss mice.

Post-natal physical and reflexology development evaluation have shown no differences between WT and mutant mice from birth to three weeks of age, demonstrating that mutants have a normal development until three weeks of age, as suggested by the initial observations about mutant phenotype. Besides post-natal development evaluation, WT and mutant mice went through OFT with three and eight weeks of age, in which general activity was analyzed. Mutants showed higher grooming frequency than WT mice at 3 weeks of age, denoting ongoing motor impairment. Additionally, decreasing in rearing frequency, shorter distance traveled and lower average speed in mutants with three and eight weeks of age compared to WT mice occurred as a result of motor disability caused by the mutation.

Concomitantly to phenotypic characterization of mutant mice, genetic mapping with microsatellite markers was performed in an attempt to identify the mutated gene. A linkage was identified on chromosome 14, between 33.21 and 38.21 cM, making Egr3 the main candidate gene. Egr3-deficient mice have severe ataxia, resting tremors, scoliosis and ptosis caused by lack of muscle spindles, which are skeletal muscle sensory organs involved in the proprioception [29]. However, this phenotype is quite different of our mutants, which presented movement tremors and audiogenic seizures, and do not show scoliosis or ptosis.

Egr3, a member of the early growth response (Egr) transcription factor family that includes four proteins (Egr 1, 2, 3, and 4), is responsible for transcription factors of zinc-finger family and may have multiple roles in epileptogenesis [30,31]. Egr3 overexpression was related to susceptibility of audiogenic seizures in the WAR rats and GASH:Sal hamsters, likewise Egr3 expression was increased in the hippocampus of patients and animal models of temporal lobe epilepsy [8]. Induction of Egr family transcription factors occurs after pilocarpine-induced status epilepticus

in mice, showing increased mRNA and protein levels of Egr3 in the hippocampus [32]. In the pilocarpine-induced rodent model, Egr3 is involved in the modulation of GABAergic receptors in dentate granule cells of the hippocampus, resulting in decreased expression of GABAA receptor alpha 1 subunit and increased alpha 4 subunit expression [30].

Corroborating with the literature, our results demonstrated overexpression of Egr3 mRNA in the hippocampus of mutants that was 3.7-fold higher when compared to WT mice. Data distribution (Fig 1) showed that Egr3 expression range was 6.65 in mutant mice. As naive mice (i.e., do not submitted to acoustic stimuli) were used for gene expression assessment, this finding suggests that spontaneous seizures could occur in mutants, ranging between animals.

As a general view, even though no mutation has been found in the Egr3 DNA sequences analyzed, the reports above reinforce that an impairment of Egr3 gene function, which is located on the interval mapped for the mutation, could explain the mechanism involved in seizures and tremor observed in our mutant strain.

Literature have described both TST and FST as tools to evaluate depressionlike responses in mice [23,24]. However, recent publications have interpreted immobility time in the FST as a way to express passive coping behavior that might be determined by genetic factors [33,34]. Our results showed reduced immobility period in mutant compared to WT mice in the TST and FST, which can be understood as lack of coping behavior to an acute stressor of mutant animals; however, these data require further investigation. Corroborating with our findings, Egr3-deficient mice showed hyperactivity facing a new environment and they failed to habituate to repeated acoustic stimulus that might indicate a lack of behavioral adaptation to an acute stressor [35]. However, tail suspension test and forced swim test showed lack of behavioral adaptation to an acute stressor in mutants.

In the balance beam test, mutant mouse presented a characteristic posture, by grabbing the beam with its hind limbs and rolling tail around the beam to avoid falling. To walk across the beam, the mouse supports the abdomen on it. In spite of the difficulty to cross the beam, mutants were able to do it, showing that their severe motor impairment did not interfere with environment exploration (supplementary material – S4 and S5, videos 3 and 4). In addition, a longer period was taken to cross

the bar by mutants compared to WT, and mutants showed the highest number of falls at eight weeks of age. Additionally, results from T-maze alternation test showed that mutants presented a prominent motor deficiency but did not show spatial memory alterations when compared to WT mice. Different from our data, Egr3-deficient mice performed fewer sequential arm entries compared with controls, in a Y-maze spontaneous alternation task, suggesting immediate memory impairment [35].

Often clonic seizures can occur in mutant mice in response to acoustic and/or environmental stimuli, but the mechanism involved in these seizures has not been fully acknowledged yet. Our results showed increased content of GABA, glutamate and aspartate in the hippocampus of mutants. Very similar results were described for spontaneous recurrent seizures on the pilocarpine-induced model in rats [36] and after a single acoustic stimulation in audiogenic seizure-prone Rb1 mice [5]. Increased concentration levels of glutamate and GABA in the extracellular matrix might influence on epilepsy development and evolution, possibly because of the activation of extra-synaptic receptors [37]. Impairment of GABAergic neurotransmission has been described as a main neurochemical mechanism involved in audiogenic seizures in different animal models of epilepsy. Low levels of GABA were detected in the hippocampus of II-6 KO, Rb1 (clonic-tonic seizure-prone) and Rb2 (clonic seizure-prone) mice, susceptible to audiogenic seizures. Seizureprone BALB/c mice showed reduced GABA concentrations in the striatum, and DBA/2 mice presented fewer GABA biding sites in whole brain when compared to seizure resistant mice [6,28].

Diazepam administration prior to acoustic stimuli inhibited seizures in mutant mice, probably due to its action on facilitating GABA-ergic transmission and reducing extracellular hippocampal glutamate levels. It has been demonstrated that activation of GABAA receptors, by binding on regulatory sites, was the main mechanism of diazepam to prevent pilocarpine-induced seizures [38], since diazepam interaction with these sites increases frequency of chlorine channels opening and enhances neuronal chloride-ion influx, resulting in postsynaptic membrane hyperpolarization and reduced neuronal excitability. In previous studies, diazepam had demonstrated protective effects against the tonic, clonic and wild running phase of audiogenic seizures in DBA/2J mice [39].

Audiogenic seizures are triggered in the brainstem neural network involved in sound processing, mainly the inferior colliculus [27]. Hippocampus seems to be

included in the modulation of that network, considering that impairment of the hippocampal integrity or function are associated with the development of audiogenic seizures susceptibility in previously normal animals [40–42]. Additionally, rodents genetically prone to audiogenic seizures show alterations in the hippocampal function [6,28,43–47]. Imbalance between excitatory and inhibitory activity, which is regulated by neurotransmitters, results on increased seizure frequency [48]. Disparity of neurotransmitters in the hippocampus concerned with hypoactivity of GABA and hyperactivity of glutamate has been reported in generalized epilepsy [49]. Therefore, studying neurochemical changes in CNS is essential for a better understanding of seizure development and occurrence.

Increased extracellular glutamate is an important biochemical marker of animal and human epileptic nervous tissues and provokes neurotoxicity and seizures [50]. GABA presents inhibitory effects on hippocampal excitability and seizure activity, and rising levels of this amino acid during seizures probably leads to inhibition of the following seizure. Raised levels of glutamate might be related to seizure initiation process whilst the following rising level of GABA contributes to end the process [37].

Raised aspartate concentration levels on mutants hippocampus may have occurred due to raised levels of glutamate, considering that studies showed both are synchronously released and are related to excitatory synaptic activity on hippocampus [51]. Alike, increased aspartate levels were demonstrated in hippocampus and brainstem of II-6 KO seizure prone mice [6] and inferior colliculus of Rb1 mice [5].

In contrast to results described by Cavalheiro et al. [36] during chronic seizures in the pilocarpine-induced model, glycine levels were decreased in mutants hippocampus. Low glycine levels in different brain areas were associated with increased susceptibility of audiogenic seizures in DBA/2J, II-6 KO, seizure-prone BALB/c and Rb1 mice [6,52,53]. Glycine can present opposite effects on hippocampus development, depending on a pre and post-synaptic neurons balance activation [54]. Also, Chen et al. [55] demonstrated that low glycine concentration in hippocampus has pro-convulsant effects whilst high concentrations seem to attenuate recurrent epileptic discharges. Mutants presented raised levels of 5-HT and the corresponding metabolite 5HIAA in hippocampus; however, the neurotransmitter activity was similar to WT mice. In agreement with our findings, other authors

described higher baseline contents of serotonin and its metabolite in the temporal cortex, hippocampus and medulla of Krushinsky–Molodkina (KM) rats than in control Wistar rats [7], and in the hippocampus of Egr3-deficient mice [56]. Contrary to glutamate and GABA, extracellular increasing of 5-HT is not directly related to seizure activity in hippocampus [37]. According to the authors, increased levels of 5-HT after pilocarpine and picrotoxin injections might result from muscarinic receptors activation or GABAA receptors blockage on serotonergic nerve endings in hippocampus.

In addition, serotonin is associated with physiological functions in the CNS, such as motor control. This monoamine produces a complex modulatory control over neurotransmission in the hippocampus, frontal cortex and cerebellum, modulating excitatory effects by glutamate and inhibitory ones by GABA [57]. Endogenous or exogenous 5-HT exerts an anticonvulsant effect, due to raised GABAergic responses from hippocampus neurons, mediated by 5-HT1 receptors activation. Still, high concentrations of 5-HT in extracellular matrix leaded to more intense seizures, and has been associated to significant increased levels of extracellular glutamate, suggesting a modulatory effect of glutamate on monoamine anticonvulsant activity [48]. In sudden unexpected death in epilepsy, 5-HT abnormal activity are involved in the pathogenesis of seizure-induced respiratory arrest in genetically susceptible to audiogenic seizures DBA mice [58].

Noradrenaline plays an important role in the limbic system preventing the damage induced by status epilepticus [59]. The extracellular concentration of NOR was increased in the hippocampus, but its activity was decreased in the mutant compared to WT mice. The anticonvulsant effect of noradrenaline has been described in the literature, and their levels are reduced after seizures [48,59]. Low levels of noradrenaline in the brain of GEPR-9 rats susceptible to audiogenic seizure was associated with the severity of epileptic phenotype [59]. The administration of noradrenaline at low concentrations in rats hippocampal CA3 region induced a proconvulsant effect, while high concentrations had an anticonvulsant activity [49]. On the other hand, either low or high levels of noradrenaline may have also proconvulsant effects, which might be mediated by alpha2-adrenergic receptors. However, the mechanism of action by which NOR may achieve its pro or anticonvulsant effects remains unclear [48,59].

3.5 CONCLUSIONS

In this work, data demonstrated that audiogenic seizures of *tremor* mice are associated to progressive motor impairment, evidenced by reduction of rearing and grooming frequency and increased number of falls in balance beam crosses at 8 weeks old, as well as to hippocampal alterations of the Egr3 and Gabra1 gene expression and amino acid and monoamine content. In addition, our mutant could be useful for study of neurotransmission pathways as modulators of epilepsy. Further studies are required to better characterize behavior, electroencephalography and brain pathology of the *tremor* mice, which could be a new mouse model to better understand the pathogenesis of epilepsies occurring with generalized clonic seizures.

ACKNOWLEDGEMENTS

This manuscript is based upon work supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) under grant number 2017/21103-3, and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. We thank the Core Facility for Scientific Research – University of Sao Paulo (CEFAP-USP/GENIAL). The authors would like to thank too Mr. Mauro de Mattos who found out the mutant in our mice colony, and Mrs. Luciana Bandini responsible for animal care and husbandry.

FUNDING

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) under grant number 2017/21103-3, and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — Brasil (CAPES) — Finance Code 001.

3.6 REFERENCES

- [1] Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE OFFICIAL REPORT A practical clinical definition of epilepsy 2014:475– 82. doi:10.1111/epi.12550.
- [2] Serikawa T, Mashimo T, Kuramoto T, Voigt B, Ohno Y, Sasa M. Genetic Rat Models of Epilepsy. Exp Anim 2015;64:1–7. doi:10.1538/expanim.14-0066.
- [3] Frankel WN. Detecting genes in new and old mouse models for epilepsy: A prospectus through the magnifying glass. Epilepsy Res 1999;36:97–110. doi:10.1016/S0920-1211(99)00044-3.
- [4] Grone BP, Baraban SC. Animal models in epilepsy research: Legacies and new directions. Nat Neurosci 2015;18:339–43. doi:10.1038/nn.3934.
- [5] Simler S, Ciesielski L, Clement J, Rastegar A, Mandel P. Long Lasting Effects of Audiogenic Seizures on Synaptosomal Neurotransmitter Amino Acids in Rb Mice. Neurochem Res 1994;19:555–61. doi:10.1007/bf00971330.
- [6] De Luca G, Di Giorgio RM, Macaione S, Calpona PR, Costantino S, Di Paola ED, et al. Susceptibility to audiogenic seizure and neurotransmitter amino acid levels in different brain areas of IL-6-deficient mice. Pharmacol Biochem Behav 2004;78:75–81. doi:10.1016/j.pbb.2004.02.004.
- [7] Poletaeva II, Surina NM, Kostina ZA, Perepelkina OV., Fedotova IB. The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65 years. Epilepsy Behav 2017;71:130–41. doi:10.1016/j.yebeh.2015.04.072.
- [8] López-López D, Gómez-Nieto R, Herrero-Turrión MJ, García-Cairasco N, Sánchez-Benito D, Ludeña MD, et al. Overexpression of the immediate-early genes Egr1, Egr2, and Egr3 in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures. Epilepsy Behav 2017;71:226–37. doi:10.1016/j.yebeh.2015.12.020.
- [9] Davisson MT, Bergstrom DE, Reinholdt LG, Donahue LR. Discovery Genetics -The History and Future of Spontaneous Mutation Research. Curr Protoc Mouse Biol 2012;2:103–18. doi:10.1002/9780470942390.mo110200.
- [10] Guénet JL. Chemical mutagenesis of the mouse genome: An overview. Genetica 2004;122:9–24. doi:10.1007/s10709-004-1442-8.

- [11] National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academies Press; 2010.
- [12] Sanger F, Nicklen S. DNA sequencing with chain-terminating 1977;74:5463–7.
- [13] Spijker S. Chapter 2 Dissection of Rodent Brain Regions. Neuromethods 2011;57:13–26. doi:10.1007/978-1-61779-111-6.
- [14] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta C$ T Method. Methods 2001;408:402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [15] Heyser CJ. Assessment of Developmental Milestones in Rodents. Curr Protoc Neurosci 2004:1–15. doi:10.1002/0471142301.ns0818s25.
- [16] Feather-Schussler DN, Ferguson TS. A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. J Vis Exp 2016:1–12. doi:10.3791/53569.
- [17] Fox WM. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. Anim Behav 1965;13:234-IN5. doi:10.1016/0003-3472(65)90041-2.
- [18] Manes M, Garcia-Gomes M de SA, Sandini TM, Zaccarelli-Magalhães J, Florio JC, Alexandre-Ribeiro SR, et al. Behavioral and Neurochemical Characterization of the Mlh Mutant Mice Lacking Otoconia. Behav Brain Res 2019;359:958–66. doi:10.1016/j.bbr.2018.06.012.
- [19] Noldus LPJJ, Spink AJ, Tegelenbosch RAJ. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. Behav Res Methods, Instruments, Comput 2001;33:398–414. doi:10.3758/BF03195394.
- [20] Yamamoto PK, Souza TA, Antiorio ATFB, Zanatto DA, Garcia-Gomes M de SA, Alexandre-Ribeiro SR, et al. Genetic and behavioral characterization of a *Kmt2d* mouse mutant, a new model for Kabuki Syndrome. Genes, Brain Behav 2019:e12568. doi:10.1111/gbb.12568.
- [21] Deacon RMJJ, Rawlins JNP. T-maze alternation in the rodent. Nat Protoc 2006;1:7–12. doi:10.1038/nprot.2006.2.
- [22] Shefer S, Gordon C, Avraham KB, Mintz M. Balance deficit enhances anxiety and balance training decreases anxiety in vestibular mutant mice. Behav Brain Res 2015;276:76–83. doi:10.1016/j.bbr.2014.06.046.

- [23] Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The Mouse Forced Swim Test. J Vis Exp 2011;59:1–6. doi:10.3791/3638.
- [24] Can A, Dao DT, Terrillion CE, Piantadosi SC, Bhat S, Gould TD. The Tail Suspension Test. J Vis Exp 2011:3–7. doi:10.3791/3769.
- [25] Sandini TM, Reis-Silva TM, Moreira N, Bernardi MM, Lebrun I, Spinosa H de S. Effects of isoflavones on behavior, estradiol, glutamate, and GABA levels in intact middle-aged female rats. Nutr Neurosci 2018;0:1–12. doi:10.1080/1028415X.2018.1447296.
- [26] Ross KC, Coleman JR. Developmental and genetic audiogenic seizure models: Behavior and biological substrates. Neurosci Biobehav Rev 2000;24:639–53. doi:10.1016/S0149-7634(00)00029-4.
- [27] Garcia-Cairasco N, Terra VC, Doretto MC. Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. Behav Brain Res 1993;58:57–67. doi:10.1016/0166-4328(93)90090-d.
- [28] Prieto-Martín AI, Aroca-Aguilar JD, Sánchez-Sánchez F, Muñoz LJ, López DE, Escribano J, et al. Molecular and neurochemical substrates of the audiogenic seizure strains: The GASH:Sal model. Epilepsy Behav 2017;71:218–25. doi:10.1016/j.yebeh.2015.05.025.
- [29] Tourtellotte WG, Milbrandt J. Sensory ataxia and muscle spindle agenesis in mice lacking the transcription factor Egr3. Nat Genet 1998;20:87–91. doi:10.1038/1757.
- [30] Brooks-Kayal AR, Raol YH, Russek SJ. Alteration of Epileptogenesis Genes. Neurotherapeutics 2009;6:312–8. doi:10.1016/j.nurt.2009.01.019.
- [31] Grabenstatter HL, Russek SJ, Brooks-Kayal AR. Molecular pathways controlling inhibitory receptor expression. Epilepsia 2012;53:71–8. doi:10.1111/epi.12036.
- [32] Roberts DS, Raol YH, Bandyopadhyay S, Lund IV, Budreck EC, Passini MA, et al. Egr3 stimulation of GABRA4 promoter activity as a mechanism for seizureinduced up-regulation of GABAA receptor _4 subunit expression 2005;102:11894–9.

- [33] Colelli V, Campus P, Conversi D, Orsini C, Cabib S. Either the dorsal hippocampus or the dorsolateral striatum is selectively involved in consolidation of forced swim-induced immobility depending on genetic background. Neurobiol Learn Mem 2014;111:49–55. doi:10.1016/j.nlm.2014.03.004.
- [34] Molendijk ML, de Kloet ER. Coping with the forced swim stressor: Current state-of-the-art. Behav Brain Res 2019;364:1–10. doi:10.1016/j.bbr.2019.02.005.
- [35] Gallitano-mendel A, Izumi Y, Tokuda K, Zorumski CF, Howell MP, Muglia LJ, et al. The immediate early gene Early Growth Response gene 3 2007;148:633– 43. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.05.050.
- [36] Cavalheiro, E. A.; Fernandes, M.J.; Turski, L.; Naffah-Mazzacoratti MG. Spontaneous Recurrent Seizures in Rats: Amino Acid and Monoamine Determination in the Hippocampus. Epilepsia 1994;35:1–11. doi:doi.org/10.1111/j.1528-1157.1994.tb02905.x.
- [37] Meurs A, Clinckers R, Ebinger G, Michotte Y, Smolders I. Seizure activity and changes in hippocampal extracellular glutamate, GABA, dopamine and serotonin. Epilepsy Res 2008;78:50–9. doi:10.1016/j.eplepsyres.2007.10.007.
- [38] Khan GM, Smolders I, Lindekens H, Manil J, Ebinger G, Michotte Y. Effects of diazepam on extracellular brain neurotransmitters in pilocarpine-induced seizures in rats. Eur J Pharmacol 1999;373:153–61. doi:https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00209-5.
- [39] De Sarro G, Russo E, Citraro R, Meldrum BS. Genetically epilepsy-prone rats (GEPRs) and DBA/2 mice: Two animal models of audiogenic reflex epilepsy for the evaluation of new generation AEDs. Epilepsy Behav 2017;71:165–73. doi:10.1016/j.yebeh.2015.06.030.
- [40] Cassel JC, Kelche C, Will BE. Susceptibility to pentylenetetrazol-induced and audiogenic seizures in rats given aspirative lesions of the fimbria-fornix pathways followed by intrahippocampal grafts: a time-course approach. Restor Neurol Neurosci 1991;3:55–64.
- [41] Kawai K, Penix LRP, Kawahara N, Ruetzler CA, Klatzo I. Development of susceptibility to audiogenic seizures following cardiac arrest cerebral ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab 1995;15:248–58. doi:10.1038/jcbfm.1995.31.

- [42] Utamek-Kozioł M, Kocki J, Bogucka-Kocka A, Januszewski S, Czuczwar SJ, Pluta R. Occurrence of spontaneous and audiogenic seizures following global brain ischaemia due to cardiac arrest. Folia Neuropathol 2015;53:245–9. doi:10.5114/fn.2015.54425.
- [43] Ciesielski L, Simler S, Clement J, Mandel P. Effect of Repeated Convulsive Seizures on Brain γ-Aminobutyric Acid Metabolism in Three Sublines of Mice Differing by Their Response to Acoustic Stimulations. J Neurochem 1987;49:220–6. doi:10.1111/j.1471-4159.1987.tb03418.x.
- [44] Mesquita F, Aguiar JF, Oliveira JA, Garcia-Cairasco N, Varanda WA. Electrophysiological properties of cultured hippocampal neurons from Wistar Audiogenic Rats. Brain Res Bull 2005;65:177–83. doi:10.1016/j.brainresbull.2005.01.003.
- [45] Curia G, Gualtieri F, Bartolomeo R, Vezzali R, Biagini G. Resilience to audiogenic seizures is associated with p-ERK1/2 dephosphorylation in the subiculum of Fmr1 knockout mice. Front Cell Neurosci 2013;7:1–13. doi:10.3389/fncel.2013.00046.
- [46] Cunha AOS, Ceballos CC, De Deus JL, Pena RFDO, De Oliveira JAC, Roque AC, et al. Intrinsic and synaptic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain, a genetic model of epilepsy. Sci Rep 2018;8:1–11. doi:10.1038/s41598-018-28725-y.
- [47] Chernigovskaya E V., Korotkov AA, Dorofeeva NA, Gorbacheva EL, Kulikov AA, Glazova M V. Delayed audiogenic seizure development in a genetic rat model is associated with overactivation of ERK1/2 and disturbances in glutamatergic signaling. Epilepsy Behav 2019;99:106494. doi:10.1016/j.yebeh.2019.106494.
- [48] Navidhamidi M, Ghasemi M, Mehranfard N. Epilepsy-associated alterations in hippocampal excitability. Rev Neurosci 2017;28:307–34. doi:10.1515/revneuro-2016-0059.
- [49] Werner FM, Coveñas R. Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in generalized epilepsy in a multi-neurotransmitter system: How to improve the antiepileptic effect? Epilepsy Behav 2017;71:124–9. doi:10.1016/j.yebeh.2015.01.038.
- [50] Patel DC., Tewari BP., Chaunsalii L., Sontheimer H. Neuron glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. Nat Rev Neurosci 2019;20. doi:10.1038/s41583-019-0126-4.

- [51] Fleck MW, Palmerv AM. Aspartate and Glutamate Mediate in Area CA1 of the Hippocampus Excitatory Synaptic Transmission. J Neurosci 1993;13:3944–55. doi:https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-09-03944.1993.
- [52] Vriend J, Alexiuk NAM, Green-Johnson J, Ryan E. Determination of Amino Acids and Monoamine Neurotransmitters in Caudate Nucleus of Seizure-Resistant and Seizure-Prone BALB/c Mice. J Neurochem 1993;60:1300–7. doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb03290.x.
- [53] Simler S, Ciesielski L, Clement J, Mandel P. Amino acid neurotransmitter alterations in three sublines of Rb mice differing by their susceptibility to audiogenic seizures. Neurochem Res 1990;15:687–93. doi:10.1007/BF00973649.
- [54] Boison D. The Biochemistry and Epigenetics of Epilepsy : Focus on Adenosine and Glycine. Front Mol Neurosci 2016;9:1–7. doi:10.3389/fnmol.2016.00026.
- [55] Chen R, Okabe A, Sun H, Sharopov S, Hanganu-Opatz IL, Kolbaev SN, et al. Activation of glycine receptors modulates spontaneous epileptiform activity in the immature rat hippocampus. J Physiol 2014;592:2153–68. doi:10.1113/jphysiol.2014.271700.
- [56] Gallitano-mendel A, Wozniak DF, Pehek EA, Milbrandt J, Louis S, Louis S, et al. Micke Lacking the Immediate Early Gene Egr3 Respond to the Anti-Aggressive Effects of Clozapine Yet are Relatively Resistant to its Sedating Effects. Neuropsychopharmacology 2008;33:1266–75. doi:10.1038/sj.npp.1301505.Mice.
- [57] Ciranna L. Serotonin as a Modulator of Glutamate- and GABA-Mediated Neurotrans-mission : Implications in Physiological Functions and in Pathology. Curr Neuropharmacol 2006;4:101–14. doi:10.2174/157015906776359540.
- [58] Feng H, Faingold CL. Abnormalities of serotonergic neurotransmission in animal models of SUDEP. Epilepsy Behav 2017;71:174–80. doi:10.1016/j.yebeh.2015.06.008.
- [59] Giorgi FS, Pizzanelli C, Biagioni F, Murri L, Fornai F. The role of norepinephrine in epilepsy: From the bench to the bedside. Neurosci Biobehav Rev 2004;28:507–24. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.06.008.

WEB REFERENCES

www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy last accessed on November, 2019.

www.informatics.jax.org / last accessed on November, 2019.

www.ensembl.org last accessed on November, 2019.

FIGURE AND TABLE CAPTIONS



Figure 1. Fold changes in Egr3 and Gabra1 gene expression in the hippocampus of mutant mice (n=6) on C57BL/6 background measured by RT-qPCR. Data are present as individual points, medians and quartiles. Descriptive statistics was used.



Figure 2. Body weight from one to three weeks of age (a); body length (b); parameters of physical (c) and reflexology development (d); and body weight from 4 to 24 weeks of age \in in mutant (n=34) and WT (n=34) mice. Data are presented as the means ± SEM. Two-way ANOVA followed by Sidak's multicomparisons test was employed to evaluate strain and sex differences.



Figure 3. General activity in the open field: distance traveled (a); average speed (b); grooming (c and d); and rearing (e and f) in mutant (n=20) and WT (n=20) mice. Data are presented as the means \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Sidak's multicomparisons test was employed to evaluate strain and sex differences.



Figure 4. Balance beam test: (a) scores (n=16 mutants and 16 WT); (b and c) time taken to cross the beam and number of falls (n=8 mutants and 11 WT); (d) T maze alternation test (n=20 mutants and 20 WT); (e and f) latency to the first immobility and total immobility time in the FST and TST in mutant (n=8) and WT (n=8) mice. Data are presented as the means \pm SEM or medians and the interquartile range. Two-way ANOVA followed by Sidak's multicomparisons test was employed to evaluate strain and sex differences.



Figure 5. Neurotransmitter amino acid tissue contents (ng/g wet weight tissue) in hippocampus of WT and mutant male mice. Data are presented as the means \pm

SEM. Unpaired t test with Welch's correction was employed to evaluate strain differences. GABA (gamma-Aminobutyric acid), GLU (glutamate), GLY (glycine) and ASP (aspartate).

	Testing age	WT	Mutant	
Genetic manning			78 male and	
Genetic mapping			females	
DNA sequencing	_	2 females	2 females	
Gene expression	Between 8 and	6 females	6 females	
	10-weeks			
Postnatal	At hirth	34 males and	34 males and	
development		females	females	
Open field test	At 3 and 8-weeks	8 males, 12	8 males, 12	
T-maze test	At 9-weeks	females*	females*	
Balance beam test				
(time and number	At 3 and 8-weeks	11 males	8 males	
of falls)				
Balance beam test	At 8-weeks	8 males 8 females	8 males 8 females	
(score)			o males, o remales	
Forced swim test	At 9-weeks			
Tail suspension	At 10-weeks	8 males	8 males	
test				
Acoustic stimuli	Between 10 and	10 males, 10	10 males, 10	
	12-weeks	females	females	
Measurement of	At 10-weeks	10 males	10 males	
neurotransmitters		10 110105	10 110105	

Table 1. Description of mice used in each experiment.	
--	--

* These animals were the same used for postnatal development.

Table 2. Neurotransmitter tissue contents (ng/g wet weight tissue) and turnover rates in hippocampus of WT and mutant male mice. Data are presented as the means \pm SEM.

	Group		
- Monoamines and metabolites	WT	mutant	
DA	27.47±9.17 (n=9)	23.77±4.43 (n=9)	
DOPAC	10.22±0.94 (n=9)	11.36±1.29 (n=9)	
HVA	45.98±6.72 (n=9)	69.54±10.95 (n=10)	
(DOPAC+HVA)/DA ratio	4.30±1.40 (n=9)	3.64±0.58 (n=9)	
NOR	479.10±27.14 (n=10)	608.93±18.51* (n=10)	
VMA	241.57±18.79 (n=10)	260.49±13.24 (n=10)	
VMA/NOR ratio	0.50±0.02 (n=10)	0.42±0.01* (n=10)	
5HT	551.09±38.93 (n=10)	727.51±44.78* (n=10)	
5HIAA	363.51±24.38 (n=10)	545.68±44.92* (n=10)	
5HIAA/5HT ratio	0.66±0.03 (n=10)	0.74±0.04 (n=10)	

DA (dopamine), DOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid), HVA (homovanillic acid), NOR (noradrenaline), VMA (vanillylmandelic acid), 5HT (5-hydroxytryptamine) and 5HIAA (5-hydroxyindole acetic acid).

*p<0.05, unpaired t test with Welch's correction was employed to evaluate strain differences.

Supplementary Material Captions

S1. Supplementary table 1. Primer sequences designed to amplify the 3 code exons of Egr3 gene.

Forward	Reverse	Product	exon
		(bp)	
CTGGAAGCTGCGTTAGGAAC	GATATGTGCATCCATCGCTAG	317	1
CTGGAAGCTGCGTTAGGAAC	GTGGGAAAAGCAACTCGCC	441	1
TTTGCTGTATCCAGGTTGCG	GCAGATCCGACACTGGAA	967	1 and 2
CTCTACTCCTGGGCAAGGAC	CACAGAACTCACAGGCAAAGG	949	2
CTAGCGATGGATGCACATATC	GCTAAGGAGAGTGGAGAGCG	613	2
GATATGTGCATCCATCGCTAG	GGTCTGGCGAAGGTTAGATG	831	3

S2. Supplementary material 2 – video 1. Mutant mouse presenting tremor and ataxia in the OFT.

S3. Supplementary material 3 – video 2. Mutant mouse presenting seizure after acoustic stimuli.

S4. Supplementary material 4 – video 3. Elevated beam test comparing mutant and WT mouse phenotype while crossing the beam.

S5. Supplementary material 5 – video 4. Elevated beam test showing mutant mouse with characteristic posture, by grabbing the beam with its hind limbs and rolling tail around the beam to avoid falling.

4. CAPÍTULO 2 Alteration of hippocampal Egr3, GABA A receptors, II-1 β and CcI3 expression in audiogenic *tremor* mice after seizure

Esse *Brief Communication* publicado na revista Epilepsy & Behavior, em outubro de 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2022.108962

Alteration of hippocampal Egr3, GABA A receptors, II-1 β and Ccl3 expression in audiogenic *tremor* mice after seizure

Mariana de Souza Aranha Garcia-Gomes, Pedro Kenzo Yamamoto, Silvia Maria Gomes Massironi, Orfa Yineth Galvis-Alonso, Jorge Mejia, Dennis Albert Zanatto, Sandra Regina Alexandre-Ribeiro, Susan Ienne, Claudia Madalena Cabrera Mori

Highlights

Hippocampal proinflammatory cytokines and GABA A receptors were altered after seizure.

Overexpression of Ccl3 mRNA was observed in the hippocampus of naive tremor mice.

Hippocampal II-1 β and Ccl3 expression were downregulated in stimulated tremor mice.

Low expression of Egr3, Gabra1, and Gabra4 mRNA were detected in naive tremor mice.

Egr3, Gabra1, and Gabra4 expression increased in the hippocampus of stimulated mice.

ABSTRACT

Abstract

Neuroinflammation plays a protective role in the brain; however, in neurological such as epilepsy, overactivated neuroinflammation, along with diseases overexpression of inflammatory mediators, can cause neuronal tissue damage, which can trigger seizures due to loss of ionic or neurotransmitter homeostasis. Therefore, we aimed to evaluate mRNA expression levels of proinflammatory cytokines, early growth response factor 3 (Egr3) and GABA A receptors in the hippocampus of naive audiogenic mutant tremor mice, and stimulated tremor mice after seizure. Gene expression of II-1 β , II-6, Tnf- α , Ccl2, Ccl3, Egr3, Gabra1 and Gabra4 from hippocampal samples of naive and stimulated tremor mice were measured by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (gRT-PCR). Relative to resistant mice, Ccl3 gene expression was increased and II6 was decreased in the hippocampus of naïve tremor mice. Thirty minutes after seizure, Ccl3 and II-1ß mRNA expression were decreased (p<0.0001; p=0.0034, respectively) while II6 was increased (p=0.0052) in stimulated tremor mice, relative to naïve animals. In addition, Egr3, Gabra1 and Gabra4 mRNA expression was decreased in the hippocampus of naive tremor mice, relative to resistant mice, which increased 30 minutes after seizure (p=0.0496; p=0.0447, and p=0.0011, respectively), relative to naïve animals. In conclusion, overexpression of Ccl3 in the hippocampus of naive tremor mice, followed by downregulation soon after seizure in stimulated tremor mice, could be involved in changes of the blood-brain barrier (BBB) permeability in epilepsy. II-1ß may be involved in hippocampal downregulation of GABA A receptors of naive tremor mice, characterizing an important mechanism in audiogenic seizures triggering. Hippocampal alterations of proinflammatory cytokines, Egr3 and GABA A receptors in tremor mice reinforces them as an alternative tool to modeling temporal lobe epilepsy.

KEYWORDS: Audiogenic seizure; GABA A receptor; proinflammatory cytokines; neuroinflammation; *tremor* mice
4.1 INTRODUCTION

Recent reports support the important role of proinflammatory cytokines in pathogenesis of epilepsy. Neuroinflammation is a common process originated from different kinds of injuries in the brain, including seizures [1]. As a result of tissue damage some macrophages are activated releasing proinflammatory cytokines, such as Interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). These are some of the main proinflammatory cytokines expressed by most brain cells, such as microglia, neurons and endothelial cells [2]. Previous studies demonstrated that low levels of these cytokines are present in healthy adult brain, helping to maintain its physiological condition [2,3]. Low levels of IL-6 and TNF-a have a neuroprotective and anticonvulsant effect through blocking IL-1r mediated activity, which blocks the neurotoxic effects of IL-1ß [4]. Despite its important protective action in the brain, overactivated neuroinflammation, along with overexpressed inflammatory mediators, may damage neuronal tissue, in neurological diseases such as epilepsy. Seizures can lead to inflammation through raised levels of glial proinflammatory cytokines, which can trigger seizures by loss of ionic or neurotransmitter homeostasis, indicating a complex relationship between seizures and neuroinflammation [1].

The main inflammatory changes seen in epilepsy include astrogliosis, activation of microglia, and increased permeability of the blood-brain barrier (BBB), followed by raised proinflammatory cytokine expression [5]. Although there is no consensus in the literature, several studies have suggested raised levels of proinflammatory cytokines, chemokines and adhesion proteins in the brain before and after seizures occur [5]. Different mechanisms may be involved in the proconvulsive activity of these molecules in the brain, such as triggering oxidative stress, perpetuating neuroinflammation by increasing the release of proinflammatory cytokines and BBB breakdown [6].

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α /CCL3) are key chemokines that regulate migration and infiltration of monocytes and macrophages induced by inflammatory stimuli [7]. It was demonstrated that raised levels of CCL2 and CCL3 were involved in recruitment of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, memory T cells and dendritic cells in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy (TLE) [8]. Upregulation of CCL2

was also associated with changes in BBB permeability and leukocyte recruitment following pilocarpine-induced SE in mice and kainate-induced seizure in rats [6]. In addition, IL-1 β , IL-6 and TNF- α may influence neurotransmission in the central nervous system (CNS), stimulating the release of excitatory neurotransmitters such as glutamate and decreasing the release of the inhibitory neurotransmitter gammaaminobutyric acid (GABA) [2]. Further, seizures are known to occur as a result of altered excitatory/inhibitory balance; therefore, dysfunction of GABA A receptors, the most important inhibitory receptors in the CNS, may generate and contribute to the spread of seizures [9]. Early growth response factor 3 (Egr3) regulates the gene expression of GABA A receptors α 1 and α 4. Overexpression of Egr3 in the brain results in changes of GABA A receptor concentration, contributing to neuronal hyperexcitability and raised susceptibility to seizures [10].

In a previous study of our team, the spontaneous mutant mouse named tremor, with autosomal recessive inheritance pattern, was described. This new mutant was characterized by motor impairment and audiogenic seizures associated with altered levels of glycine, GABA, glutamate, aspartate, noradrenaline, and serotonin in the hippocampus, being a promising model for the study of neurotransmission path ways as epilepsy modulators [11]. In contrast to other animal models where seizures are induced in normal brains (e.g., pentylenetetrazole, electrical kindling, 6Hz or status epilepticus models [12-14], in tremor mice seizures are induced under controlled conditions, without the use of implanted devices or proconvulsant drugs, in an already epilepsy-prone brain. Additionally, it has been shown that repeated audiogenic seizures in a kindling paradigm induces limbic epileptogenesis [15-17]. Therefore, tremor mice can be considered a new tool to model temporal lobe epilepsy, the most frequent human pharmacoresistant form of epilepsy. In the search for other mechanisms involved in triggering seizures, this study aimed to investigate the profile of proinflammatory cytokines and GABA A receptors in the hippocampus of tremor mutant mice after seizure induced by acoustic stimulus.

4.2 MATERIAL AND METHODS

4.2.1 Ethics statement

The Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA/FMVZ/USP) approved the research protocol under number 4864190717. Experimental procedures were carried out in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the US National Research Council [18]. The experiments were performed under proper laboratory practice protocols and following quality assurance methods. All efforts were made to minimize animal suffering.

4.2.2 Mice

Mice were bred at the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Brazil. They were housed in polypropylene individually ventilated cages with 408 cm2 of floor area and 12 cm height (Alesco Indústria e Comércio, Monte Mor, Brazil) with pine shavings for bedding, under controlled room temperature of 22 ± 2 °C, with an air relative humidity of 45–65 %. Animals had unrestricted access to filtered and autoclaved water and to irradiated commercial diet formulated according to the AIN-93M formulation (Nuvilab, Quimtia, Paraná, Brazil). Room was kept on a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 07:00 am) at artificial light.

Eighteen female mice (3 to 6 animals/cage), 12-16 weeks old, were used. For that, Swiss–Webster audiogenic tremor mutant males were crossed with Swiss–Webster females to produce heterozygous F1 progeny. F1 females were backcrossed with tremor mutant males to produce offspring that were 50% heterozygous (audiogenic resistant) and 50% homozygous (audiogenic susceptible) for mutation.

Animals were divided in 3 groups (n=6/group). Gr1: naive tremor mice (audiogenic susceptible tremor mice not submitted to acoustic stimuli); Gr2: stimulated tremor mice (audiogenic susceptible tremor mice submitted to acoustic stimuli); Gr3: audiogenic resistant mice submitted to acoustic stimuli.

4.2.3 Acoustic Stimuli

For acoustic stimuli we used the protocol previously described [11]. Briefly, each mouse from Gr2 and Gr3 was placed individually in a Plexiglas cylinder (22 cm in diameter, 30 cm in height) and allowed to explore for 30 s. A 130-Watt ultrasonic processor (Sonic and Materials Inc., Newtown, CT, USA), with operating frequency of 20 kHz was turned on until onset of convulsion or for a maximum of 60 s. Each animal was submitted only once to the acoustic stimulus and the latency to onset of seizure was recorded. Tests were videotaped for later evaluation. All mice were euthanized at the same day by overdose of sevoflurane. Gr2 animals were euthanized 30 minutes after seizure, and Gr3 animals 30 minutes after stimulation. The hippocampi were dissected and immediately frozen at -80 °C until assayed.

4.2.4 Gene expression

Gene expression was performed as previously described, with some modifications [19]. Total ribonucleic acid (RNA) was extracted from 30 mg of hippocampus tissue homogenate, immediately frozen in liquid nitrogen, and purified using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit and RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's protocols. The RNA samples were first analyzed by Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The RNA quality was determined by the A260/A280 (close to 2) and A260/A230 (close to 2) ratios, and qualified RNA samples were tested using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The RNAs with 28S/18S RNA ratio between 7 and 8 were u sed for gene expression. Reverse transcription reactions were carried out with random primers and SuperScriptTM-II reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Complementary DNA (cDNA) for qRT-PCR was prepared from 2 µg of total RNA in 20 µl reactions.

Relative gene expression of cytokines, chemokines, Egr3 and GABA A receptors was determined by qRT-PCR, using the TaqMan system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The following probes were used: tumor necrosis factor (Tnf-α, Mm00443258_m1), interleukin 1 beta (II1b, Mm00434228_m1), interleukin 6 (II-6, Mm00446190_m1), chemokine (C-C motif) ligand 2 (Ccl2, Mm00441242_m1), chemokine (C-C motif) ligand 3 (Ccl3, Mm00441258_m1), early growth response 3 (Egr3, Mm00516979_m1), gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 1 (Gabra1, Mm00439046_m1) and subunit alpha 4 (Gabra4,

Mm00802631_m1). Samples were tested in duplicates in 96-well plates using the StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The reaction was carried in a final volume of 20µl with mixture of 10µl of TaqMan[™] Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 2µl (100ng) of cDNA, 1µl of Assay Mix (probes and primers, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 7µl of ultra-pure DNAse- and RNA-se free water. TaqMan[™] MGB (minor groove binder) probes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for cytokines, chemokines, Egr3 and GABA A receptors were used. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gadph, (Mm99999915_g1) was used as reference gene. Data for each target gene were normalized to the endogenous reference gene, and the fold change in target gene expression was calculated using the 2– $\Delta\Delta$ Ct method [20]. The relative quantification of mRNA from the target gene was expressed as log2(fold change) over the mean of audiogenic resistant mice group [21].

4.2.5 Statistical Analysis

Relative quantities of cytokine, chemokine and GABA A receptor mRNA expression in naive and stimulated tremor mice were compared to those of the audiogenic resistant mice. Statistical analyses were performed using Unpaired t test, with GraphPad Prism 9.4 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Data were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical significance was considered when p value was <0.05.

4.3 RESULTS

4.3.1 Response to acoustic stimuli

During acoustic stimulation, audiogenic resistant mice displayed normal behavior with exploration and walking around the cylinder. In contrast, beginning between 1 and 2 s after the stimulus onset, tremor mice showed monophasic wild running followed by jumping, atonic falling with generalized clonic seizures, sometimes with body rolling, for a period of nearly 40 s. In the sequence, mice remained in ventral decubitus with occasional clonus and dyspnea for an additional interval of 90 to 120 s. Finally, mice recovered walking and exploring behavior with similar features to that displayed in the basal pre-stimulus condition.

4.3.2 Gene expression

Relative to resistant mice, in the hippocampus, Ccl3 gene expression was increased and II6 was decreased and Egr3, Gabra1 and Gabra4 mRNA expression was decreased in naive tremor mice (Figures 1 and 2). There was a significant decrease of II-1 β (t=3.820, df=10, p=0.0034) and Ccl3 (t=11.19, df=10, p<0.0001) mRNA in the hippocampus of tremor mice 30 minutes after seizure, when compared to naive tremor mice (Figure 1).

A significant increase in II6 (t=3.563, df=10, p=0.0052), Egr3 (t=2.233, df=10, p=0.0496), Gabra1 (t=2.294, df=10, p=0.0447) and Gabra4 (t=4.503, df=10, p=0.0011) mRNA were observed in the hippocampus of tremor mice 30 minutes after seizure, when compared to naive tremor mice (Figures 1 and 2).

No difference of Tnf- α and Ccl2 mRNA was observed in the hippocampus of tremor mice 30 minutes after seizure, when compared to those of naive tremor mice (Figure 1).

4.4 DISCUSSION

The present study revealed changes in the gene expression profile of the proinflammatory cytokines II-1 β and II6, the chemokine Ccl3, Egr3 and GABA A receptors, subunits alpha 1 and 4, in the hippocampus of naive and stimulated tremor mutant mice soon after seizure induced by acoustic stimulus.

While the basal level of II-1 β mRNA expression did not change, Ccl3 was 3.6fold change increased in the hippocampus of the naive tremor mice, which were not submitted to the acoustic stimulus. However, thirty minutes after seizure induced by acoustic stimulus, tremor mice showed a significant decrease in the expression levels of II-1 β and Ccl3: In line with our findings, low levels of II-1 β were observed in the hippocampus of epileptic mutant EL mouse between 5 minutes and 2 hours after seizures, while its expression was elevated just before the seizure occurrence [4]. According to the authors, proinflammatory cytokines raise progressively and periodically associated to the development of convulsive activity in EL mice brain. The recurrent increase of cytokines before the next seizure may play an important role triggering ictal activity. On the other hand, some studies have demonstrated raised II-1 β expression in the hippocampus of different animal models 6 hours after seizures [22–24]. The downregulation of II-1 β in the hippocampus of tremor mice thirty minutes after seizure may indicate a refractory period until the next seizure; however, additional studies are required to confirm these results.

According to the literature, IL-1 β plays an important role on seizure induction mechanisms, causing changes in the excitatory/inhibitory balance between glutamatergic and GABAergic neurotransmission [25]. Several studies have suggested that neuroinflammatory processes are common pathological features of epilepsy in humans and animals through the activation of IL-1 β and its receptor IL-1R1 in epileptogenic tissue, where they significantly contribute to the generation and recurrence of seizures in animal models [9]. As described elsewhere, IL-1 β may increase GABA and glutamate release in mice hippocampus [25]. A study carried out by our research team have shown increased basal levels of GABA and glutamate in the hippocampus of tremor mice [11]. In accordance, the present study showed downregulation of Gabra1 and Gabra4 in the hippocampus of naive tremor mice, which had a significant increase thirty minutes after seizure. A hypothesis that could explain these findings may be related to the inhibitory effect of IL-1 β on GABA A

receptors. Ictiogenic effects of IL-1 β may implicate in GABAA receptor downregulation, since high levels of IL-1 β inhibited GABAA receptor function in primary hippocampal culture of rat neurons [26]. Furthermore, IL-1 β was able to reduce GABAA receptor-mediated currents in tissue samples from the hippocampus and temporal cortex of patients with TLE [9]. Also, our results were consistent with López-López D, et al. [27] that showed upregulation of Gabra4 in the inferior colliculus of Wistar Audiogenic Rats (WAR) after seizure.

The basal expression level of Ccl3 mRNA was increased in the hippocampus of naive tremor mice, followed by a significant decrease thirty minutes after audiogenic seizure. Likewise, low levels of Ccl3/MIP-1 α mRNA were observed in the hippocampus of pilocarpine-induced model of epilepsy in mice, thirty minutes after seizure. In addition, a significant increase of Ccl3/MIP-1 α expression was demonstrated between one and two hours after seizure [28]. In experimental models of neurodegenerative diseases, such as epilepsy, IL-1 β and CCL3 recruit leukocytes to the brain, mainly monocytes and T lymphocytes, being crucial for disease progression. Further, these molecules may influence the BBB permeability, facilitating the entry of leukocytes into the CNS [29,30].

Corroborating with our results, other authors also did not observe any difference in Tnf-a expression between the hippocampus of stimulated and not stimulated WARs [3,31], in the pentylenetetrazole-induced seizure model in Wistar rats [5], and in EL mice throughout the kindling process [4]. On the other hand, hippocampal expression of II6 was downregulated in naive tremor mice, which had a significant increase in stimulated tremor mice. The role of II6 in the mechanism of audiogenic seizures is not well understood. De Sarro and colleagues correlated the susceptibility to audiogenic seizures in II6 knockout mice with a decrease of GABA levels and excessive excitatory amino-acid-mediated synaptic driving in the brain [32].

However, our results were different from other studies that found overexpression of Egr3 in the brain of stimulated WAR and GASH:Sal audiogenic hamsters, as a possible effect of stress associated with seizures [27]. Microarray analysis showed that Egr3 was the only common gene upregulated in the inferior colliculus of these two animal models. Egr3 has been associated with changes in Gabra4 expression after status epilepticus, as in the pilocarpine-induced model in which raised levels of Gabra4 and Egr3 mRNA expression were detected. In addition, it was shown that Egr3 upregulates the activity of GABA A α -4 receptors in primary culture of hippocampal neurons, and Egr3 knockout mice exhibit low levels of Gabra4 in the hippocampus [33].

4.5 CONCLUSIONS

Overall, data showed changes in gene expression of II-1 β , II6, Ccl3, Egr3, Gabra1 and Gabra4 in the hippocampus of tremor mice. Overexpression of Ccl3 in the hippocampus of naive tremor mice, followed by downregulation soon after seizure in stimulated tremor mice, could be involved in changes of the BBB permeability in epilepsy. Despite no alteration was detected in II-1 β expression between naive and seizure resistant mice, stimulated mice showed downregulation 30 minutes after seizure. Based on these findings, we suggest that II-1 β may be involved in hippocampal downregulation of GABA A receptors α 1 and α 4 of naive tremor mice, characterizing an important mechanism in audiogenic seizures triggering. Moreover, downregulation of II-1 β in stimulated mice after seizure may indicate a refractory period until the next seizure. Hippocampal alterations of proinflammatory cytokines, Egr3 and GABA A receptors in tremor mice reinforces them as an alternative tool to modeling temporal lobe epilepsy.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST All authors declare no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Core Facility for Scientific Research – University of Sao Paulo (CEFAP-USP/GENIAL). The authors would like to thank Mr. Mauro de Mattos who found out the mutant in our mice colony, and Mrs. Luciana Bandini responsible for animal care and husbandry.

FUNDING

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) under grant number 2017/21103-3, and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — Brasil (CAPES) — Finance Code 001.

4.6 REFERENCES

[1] Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. Nat Rev Neurol 2019;15:459–72. https://doi.org/10.1038/s41582-019-0217-x.

[2] Soltani Khaboushan A, Yazdanpanah N, Rezaei N. Neuroinflammation and Proinflammatory Cytokines in Epileptogenesis. Mol Neurobiol 2022;59:1724–43. https://doi.org/10.1007/s12035-022-02725-6.

[3] de Souza Bernardino TC, Teixeira AL, Miranda AS, Guidine PM, Rezende G, Doretto MC, et al. Wistar Audiogenic Rats (WAR) exhibit altered levels of cytokines and brain-derived neurotrophic factor following audiogenic seizures. Neurosci Lett 2015;597:154–8. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.04.046.

[4] Murashima YL, Suzuki J, Yoshii M. Role of cytokines during epileptogenesis and in the transition from the interictal to the ictal state in the epileptic mutant EL mouse. Gene Regul Syst Bio 2008;2:267–74.

[5] Kołosowska K, Maciejak P, Szyndler J, Turzyńska D, Sobolewska A, Płaźnik A. The role of interleukin-1β in the pentylenetetrazole-induced kindling of seizures, in the rat hippocampus. Eur J Pharmacol 2014;731:31–7. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.03.008.

[6] Fabene PF, Bramanti P, Constantin G. The emerging role for chemokines in epilepsy. J Neuroimmunol 2010;224:22–7. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.05.016.

[7] Cerri C, Caleo M, Bozzi Y. Chemokines as new inflammatory players in the pathogenesis of epilepsy. Epilepsy Res 2017;136:77–83. https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.07.016.

[8] Lee T-S, Mane S, Eid T, Zhao H, Lin A, Guan Z, et al. Gene expression in temporal lobe epilepsy is consistent with increased release of glutamate by astrocytes. Mol Med 2007;13:1–13. https://doi.org/10.2119/2006-00079.Lee.

[9] Roseti C, van Vliet EA, Cifelli P, Ruffolo G, Baayen JC, Di Castro MA, et al. GABAA currents are decreased by IL-1 β in epileptogenic tissue of patients with temporal lobe epilepsy: implications for ictogenesis. Neurobiol Dis 2015;82:311–20. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.07.003.

[10] Brooks-Kayal AR, Russek SJ. Regulation of GABAA Receptor Gene Expression and Epilepsy. Jasper's Basic Mech. Epilepsies. 4th ed., National Center for Biotechnology Information (US); 2012.

[11] Garcia-Gomes M de SA, Zanatto DA, Galvis-Alonso OY, Mejia J, Antiorio ATFB, Yamamoto PK, et al. Behavioral and neurochemical characterization of the spontaneous mutation tremor, a new mouse model of audiogenic seizures. Epilepsy Behav 2020;105:106945. https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.106945.

[12] Singh T, Mishra A, Goel RK. PTZ kindling model for epileptogenesis, refractory epilepsy, and associated comorbidities: relevance and reliability. Metab Brain Dis 2021;36:1573–90. https://doi.org/10.1007/s11011-021-00823-3.

[13] Walrave L, Maes K, Coppens J, Bentea E, Van Eeckhaut A, Massie A, et al. Validation of the 6 Hz refractory seizure mouse model for intracerebroventricularly administered compounds. Epilepsy Res 2015;115:67–72. https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2015.06.003.

[14] Gorter JA, van Vliet EA, Lopes da Silva FH. Which insights have we gained from the kindling and post-status epilepticus models? J Neurosci Methods 2016;260:96–108. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.03.025.

[15] Marescaux C, Vergnes M, Kiesmann M, Depaulis A, Micheletti G, Warter JM. Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study. Exp Neurol 1987;97:160–8. https://doi.org/10.1016/0014-4886(87)90290-1.

[16] Garcia-Cairasco N, Wakamatsu H, Oliveira JA, Gomes EL, Del Bel EA, Mello LE. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. Epilepsy Res 1996;26:177–92. https://doi.org/10.1016/s0920-1211(96)00050-2.

[17] Galvis-Alonso OY, Cortes De Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). Neuroscience 2004;125:787–802. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.01.042.

[18] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington, D.C.: National Academies Press; 2011. https://doi.org/10.17226/12910.

[19] Mesquita LP, Costa RC, Zanatto DA, Bruhn FRP, Mesquita LLR, Lara MCCSH, et al. Equine herpesvirus 1 elicits a strong pro-inflammatory response in the brain of mice. J Gen Virol 2021;102. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001556.

[20] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001;25:402–8. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

[21] Steibel JP, Poletto R, Coussens PM, Rosa GJM. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. Genomics 2009;94:146–52. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.04.008.

[22] Marini H, Altavilla D, Bellomo M, Adamo EB, Marini R, Laureanti F, et al. Modulation of IL-1 beta gene expression by lipid peroxidation inhibition after kainic acid-induced rat brain injury. Exp Neurol 2004;188:178–86. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.03.023. [23] Dhote F, Peinnequin A, Carpentier P, Baille V, Delacour C, Foquin A, et al. Prolonged inflammatory gene response following soman-induced seizures in mice. Toxicology 2007;238:166–76. https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.05.032.

[24] Johnson EA, Kan RK. The acute phase response and soman-induced status epilepticus: temporal, regional and cellular changes in rat brain cytokine concentrations. J Neuroinflammation 2010;7:40. https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-40.

[25] Zhu G, Okada M, Yoshida S, Mori F, Ueno S, Wakabayashi K, et al. Effects of interleukin-1beta on hippocampal glutamate and GABA releases associated with Ca2+-induced Ca2+ releasing systems. Epilepsy Res 2006;71:107–16. https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.05.017.

[26] Wang S, Cheng Q, Malik S, Yang J. Interleukin-1beta inhibits gammaaminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor current in cultured hippocampal neurons. J Pharmacol Exp Ther 2000;292:497–504.

[27] López-López D, Gómez-Nieto R, Herrero-Turrión MJ, García-Cairasco N, Sánchez-Benito D, Ludeña MD, et al. Overexpression of the immediate-early genes Egr1, Egr2, and Egr3 in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures. Epilepsy Behav 2017;71:226–37. https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.020.

[28] Xu JH, Long L, Tang YC, Zhang JT, Hut HT, Tang FR. CCR3, CCR2A and macrophage inflammatory protein (MIP)-1a, monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the mouse hippocampus during and after pilocarpine-induced status epilepticus (PISE). Neuropathol Appl Neurobiol 2009;35:496–514. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2009.01022.x.

[29] Guzik-Kornacka A, Sliwa A, Plucinska G, Lukasiuk K. Status epilepticus evokes prolonged increase in the expression of CCL3 and CCL4 mRNA and protein in the rat brain. Acta Neurobiol Exp (Wars) 2011;71:193–207.

[30] Nemeth DP, Quan N. Modulation of Neural Networks by Interleukin-1. Brain Plast (Amsterdam, Netherlands) 2021;7:17–32. https://doi.org/10.3233/BPL-200109.

[31] de Deus JL, Amorim MR, de Barcellos Filho PCG, de Oliveira JAC, Batalhão ME, Garcia-Cairasco N, et al. Inflammatory markers in the hippocampus after audiogenic kindling. Neurosci Lett 2020;721:134830. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134830.

[32] De Sarro G, Russo E, Ferreri G, Giuseppe B, Flocco MA, Di Paola ED, et al. Seizure susceptibility to various convulsant stimuli of knockout interleukin-6 mice. Pharmacol Biochem Behav 2004;77:761–6. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.01.012.

[33] Roberts DS, Raol YH, Bandyopadhyay S, Lund IV, Budreck EC, Passini MA, et al. Egr3 stimulation of GABRA4 promoter activity as a mechanism for seizure-induced up-regulation of GABA(A) receptor alpha4 subunit expression. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:11894–9. https://doi.org/10.1073/pnas.0501434102.

FIGURES

Figure 1. Gene expression of Tnf- α , II-1 β , II6, Ccl2 and Ccl3 in the hippocampus of audiogenic tremor mice. The relative gene expression of cytokines and chemokines of naive compared to stimulated mice 30 minutes after seizure was assessed using TaqMan assays in samples of hippocampus from six mice per group. Data are expressed as fold change (FC) estimates [log2(FC)]. Unpaired t test was used for comparison. Asterisks indicate statistical significance, p<0.05.



- Naive tremor
- Stimulated *tremor*

Figure 2. Gene expression of Egr3, Gabra1 and Gabra4 in the hippocampus of audiogenic tremor mice. The relative gene expression of Egr3 and GABA A receptors of naive compared to stimulated mice 30 minutes after seizure was assessed using TaqMan assays in samples of hippocampus from six mice per group. Data are expressed as fold change (FC) estimates [log2(FC)]. Unpaired t test was used for comparison. Asterisks indicate statistical significance, p<0.05..



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos objetivos pretendidos ao início do projeto, foi possível concluir que os camundongos mutantes *tremor* apresentam convulsões clônicas de origem audiogênica quando submetidos a estímulo sonoro de frequência de 20kHz. As crises ocorrem de forma reflexa sempre que os camundongos são submetidos a esses estímulos, característica dependente de uma condição inata a estes camundongos. Mesmo sendo uma crise epiléptica provocada, se encaixa no diagnóstico de epilepsia, fazendo com que camundongos *tremor* possam ser caracterizados como modelo espontâneo para o estudo de epilepsia.

Entre outros resultados, o mapeamento genético que indicou a região entre 33,21cM e 38,21cM do cromossomo 14 nos levou a eleger o gene Egr3 como possível candidato a carregar a mutação responsável pelas alterações presentes no camundongo *tremor*, o que possibilitou a realização do sequenciamento genético por método Sanger dos exons dos genes Egr3-204 e Egr3-201 e à resposta de que a mutação não se encontra na região sequenciada, podendo estar nos introns dessa região.

Outros genes envolvidos com a ocorrência de convulsões são: Gabra1 e 4, o que nos levou a quantificar a expressão destes genes juntamente com o Egr3 no hipocampo dos camundongos *tremor*. A expressão dos genes Egr3 e Gabra1 se mostrou aumentada no hipocampo de camundongos *tremor* em fundo genético C57BL/6 quando comparadas aos animais WT, o que indica que esses genes estão relacionados à ocorrência da convulsão destes camundongos mutantes. Quando a comparação é realizada entre camundongos *tremor* submetidos a crise epiléptica induzida por estímulo sonoro e camundongos *tremor* não submetidos, a quantificação da expressão de Gabra 1 apresenta aumento. Outro resultado obtido que nos ajuda a entender os mecanismos envolvidos na ocorrência das convulsões dos camundongos *tremor* é a quantificação dos neurotransmissores e seus respectivos metabólitos, quando comparados a camundongos WT, foram observados aumentos nas expressões de GABA, GLU, ASP, NOR, 5-HT e 5HIAA, enquanto apresenta diminuição na expressão de GLY. Não foram observadas diferenças na quantificação dos neurotransmissores da via dopaminérgica.

As citocinas quantificadas por RT-qPCR no hipocampo de camundongos *tremor* após crise epiléptica induzida por estímulo sonoro foram comparadas às de camundongos *tremor* que não passaram pela crise induzida por estímulo sonoro. Foram observadas diferenças nas quantificações de II-1 β e Ccl3, que estavam significativamente aumentadas em camundongos *tremor naive* quando comparadas a quantificação feita em camundongos *tremor* após crise epiléptica. Outras citocinas como II-6, tnf- α e Ccl2 não apresentaram aumento.

Esse estudo mostra que o camundongo mutante espontâneo *tremor* apresenta características que se assemelham muito a outros modelos animais de estudo de epilepsia e que, portanto, pode e deve ser utilizado para entender melhor os mecanismos do surgimento e do desenvolvimento dessa disfunção.

6 REFERÊNCIAS

ARISI, G. M.; FORESTI, M. L.; KATKI, K.; SHAPIRO, L. A. Increased CCL2, CCL3, CCL5, and IL-1β cytokine concentration in piriform cortex, hippocampus, and neocortex after pilocarpine-induced seizures. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 129, 2 jul. 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1186/s12974-015-0347-z.

BEGHI, E.; CARPIO, A.; FORSGREN, L.; HESDORFFER, D. C.; MALMGREN, K.; SANDER, J. W.; TOMSON, T.; HAUSER, W. A. Recommendation for a definition of acute symptomatic seizure. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 671–5, abr. 2010. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732133>.

BORBÉLY, S.; DOBÓ, E.; CZÉGÉ, D.; MOLNÁR, E.; BAKOS, M.; SZUCS, B.; VINCZE, A.; VILÁGI, I.; MIHÁLY, A. Modification of ionotropic glutamate receptormediated processes in the rat hippocampus following repeated, brief seizures. **Neuroscience**, v. 159, n. 1, p. 358–68, 3 mar. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452208018435?via%3D ihub>. Acesso em: 6 maio. 2022.

BOWEN, K. K.; DEMPSEY, R. J.; VEMUGANTI, R. Adult interleukin-6 knockout mice show compromised neurogenesis. **Neuroreport**, v. 22, n. 3, p. 126–30, 16 fev. 2011. Disponível em: ">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21266900/>. BROOKS-KAYAL, A. R.; RAOL, Y. H.; RUSSEK, S. J. Alteration of epileptogenesis genes. **Neurotherapeutics**: the journal of the American Society for **Experimental NeuroTherapeutics**, v. 6, n. 2, p. 312–8, abr. 2009. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19332325>.

BROOKS-KAYAL, A. R.; RUSSEK, S. J. **Regulation of GABAA Receptor Gene Expression and Epilepsy**. 4th. ed. [s.l.] National Center for Biotechnology Information (US), 2012.

CARREA, R.; LANARI, A. Chronic effect of tetanus toxin applied locally to the cerebral cortex of the dog. **Science (New York, N.Y.)**, v. 137, n. 3527, p. 342–3, 3 ago. 1962. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13876842>.

CONRADSEN, I.; WOLF, P.; SAMS, T.; SORENSEN, H. B. D.; BENICZKY, S. Patterns of muscle activation during generalized tonic and tonic-clonic epileptic seizures. **Epilepsia**, v. 52, n. 11, p. 2125–32, nov. 2011. Disponível em: ">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1528-1167.2011.03286.x>.

CRAIG, C. R.; COLASANTI, B. K. GABA receptors, lipids, and gangliosides in cobalt epileptic focus. **Advances in neurology**, v. 44, p. 379–91, 1986. Disponível em: https://europepmc.org/article/med/3010678>.

CURTIS, D.R.; DUGGAN, A. W. . F. D. . J. G. A. R. GABA Bicuculine and the central inhibition. **Nature Publishing Group**, v. 228, p. 1222–1224, 1970. Disponível em: https://www.nature.com/articles/228676a0.pdf>.

DHIR, A. Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. **Current protocols in neuroscience**, v. Chapter 9, n. SUPPL.58, p. Unit9.37, 2012. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042503>.

DRAGIC, S.; PAVLOVIC, V. Penicillin Epilepsy in Rats. **Acta Medica Medianae**, v. 43, n. 4, p. 19–23, 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/40765359_PENICILLIN_EPILEPSY_IN_RATS.

FAINGOLD, C. L. The genetically epilepsy-prone rat. **General pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 331–8, 1988. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2901380>.

FISHER, R. S. Animal models of the epilepsies. **Brain research. Brain research** reviews, v. 14, n. 3, p. 245–78, 1989. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2679941>.

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLOU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J. H.; ELGER, C. E.; ENGEL, J.; FORSGREN, L.; FRENCH, J. A.; GLYNN, M.; HESDORFFER, D. C.; LEE, B. I.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L.; PERUCCA, E.; SCHEFFER, I. E.; TOMSON, T.; WATANABE, M.; WIEBE, S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–82, abr. 2014. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24730690>.

FISHER, R. S.; CROSS, J. H.; FRENCH, J. A.; HIGURASHI, N.; HIRSCH, E.; JANSEN, F. E.; LAGAE, L.; MOSHÉ, S. L.; PELTOLA, J.; ROULET PEREZ, E.; SCHEFFER, I. E.; ZUBERI, S. M. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 522–530, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28276060>.

FISHER, R. S.; VAN EMDE BOAS, W.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470–2, abr. 2005. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15816939>.

GALLITANO-MENDEL, A.; IZUMI, Y.; TOKUDA, K.; ZORUMSKI, C. F.; HOWELL, M. P.; MUGLIA, L. J.; WOZNIAK, D. F.; MILBRANDT, J. The immediate early gene early growth response gene 3 mediates adaptation to stress and novelty. **Neuroscience**, v. 148, n. 3, p. 633–43, 7 set. 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2597331/pdf/nihms31714.pdf>.

GARCIA-CAIRASCO, N.; UMEOKA, E. H. L.; CORTES DE OLIVEIRA, J. A. The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 71, n. Pt B, p. 250–273, 2017. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28506440/>.

GARCIA-GOMES, M. de S. A.; ZANATTO, D. A.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; MEJIA, J.; ANTIORIO, A. T. F. B.; YAMAMOTO, P. K.; OLIVATO, M. C. M.; SANDINI, T. M.; FLÓRIO, J. C.; LEBRUN, I.; MASSIRONI, S. M. G.; ALEXANDRE-RIBEIRO, S. R.; BERNARDI, M. M.; IENNE, S.; DE SOUZA, T. A.; DAGLI, M. L. Z.; MORI, C. M. C. Behavioral and neurochemical characterization of the spontaneous mutation tremor, a new mouse model of audiogenic seizures. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 105, p. 106945, 25 fev. 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.106945>.

GOMES, M. de S. A. G. Caracterização fenotípica do camundongo mutante espontâneo tremor utilizando uma bateria de testes comportamentais. 2018. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-27112017-142503/ptbr.php>.

JOHNSON, K. R.; ZHENG, Q. Y.; WESTON, M. D.; PTACEK, L. J.; NOBEN-TRAUTH, K. The Mass1frings mutation underlies early onset hearing impairment in BUB/BnJ mice, a model for the auditory pathology of Usher syndrome IIC. **Genomics**, v. 85, n. 5, p. 582–590, 2005.

KANDRATAVICIUS, L.; BALISTA, P. A.; LOPES-AGUIAR, C.; RUGGIERO, R. N.; UMEOKA, E. H.; GARCIA-CAIRASCO, N.; BUENO-JUNIOR, L. S.; LEITE, J. P. Animal models of epilepsy: use and limitations. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 10, p. 1693–705, 2014. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25228809>.

KOPELOFF, L. M.; BARRERA, S. E.; KOPELOFF, N. RECURRENT CONVULSIVE SEIZURES IN ANIMALS PRODUCED IMMUNOLOGIC AND CHEMICAL MEANS. **American Journal of Psychiatry**, v. 98, n. 6, p. 881–902, maio 1942. Disponível em: https://ajp.psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/ajp.98.6.881.

LEE, S. J.; LEE, S. Toll-like receptors and inflammation in the CNS. **Current drug targets. Inflammation and allergy**, v. 1, n. 2, p. 181–91, jun. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14561199/>. Acesso em: 17 maio. 2022. LI, G.; BAUER, S.; NOWAK, M.; NORWOOD, B.; TACKENBERG, B.; ROSENOW, F.; KNAKE, S.; OERTEL, W. H.; HAMER, H. M. Cytokines and epilepsy. **Seizure**, v. 20, n. 3, p. 249–56, abr. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21216630/>.

LÓPEZ-LÓPEZ, D.; GÓMEZ-NIETO, R.; HERRERO-TURRIÓN, M. J.; GARCÍA-CAIRASCO, N.; SÁNCHEZ-BENITO, D.; LUDEÑA, M. D.; LÓPEZ, D. E. Overexpression of the immediate-early genes Egr1, Egr2, and Egr3 in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 71, n. Pt B, p. 226–237, 2017. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2677> LOWENSTEIN, D. H.; SIMON, R. P.; SHARP, F. R. The pattern of 72-kDa heat shock protein-like immunoreactivity in the rat brain following flurothyl-induced status epilepticus. **Brain research**, v. 531, n. 1–2, p. 173–82, 29 out. 1990. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2289119/>. Acesso em: 2 maio. 2022.

LYMAN, M.; LLOYD, D. G.; JI, X.; VIZCAYCHIPI, M. P.; MA, D. Neuroinflammation: the role and consequences. **Neuroscience research**, v. 79, n. 1, p. 1–12, fev. 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2013.10.004>.

MASIA, S. L.; DEVINSKY, O. Epilepsy and Behavior: A Brief History. **Epilepsy & Behavior**, v. 1, n. 1, p. 27–36, fev. 2000. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525505099900215. Acesso em: 15 jun. 2022.

MCKHANN, G. M.; WENZEL, H. J.; ROBBINS, C. A.; SOSUNOV, A. A.; SCHWARTZKROIN, P. A. Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality, and hippocampal pathology. **Neuroscience**, v. 122, n. 2, p. 551– 61, 2003. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614919>.

MUÑOZ, L. J.; CARBALLOSA-GAUTAM, M. M.; YANOWSKY, K.; GARCÍA-ATARÉS, N.; LÓPEZ, D. E. The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: The GASH:Sal. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 71, n. Pt B, p. 181–192, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.03.002>. NEUMANN, P. E.; COLLINS, R. L. Genetic dissection of susceptibility to audiogenic seizures in inbred mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 12, p. 5408–12, 15 jun. 1991. Disponível em: ">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC51882/>.

PALOMINO, D. C. arolin. T.; MARTI, L. C. avalheir. Chemokines and immunity. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 3, p. 469–73, 2015. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26466066>.

PEI, Y.; ZHAO, D.; HUANG, J.; CAO, L. Zinc-induced seizures: a new experimental model of epilepsy. **Epilepsia**, v. 24, n. 2, p. 169–76, abr. 1983. Disponível em: ">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1528-1157.1983.tb04876.x>.

PELTOLA, J.; HURME, M.; MIETTINEN, A.; KERÄNEN, T. Elevated levels of interleukin-6 may occur in cerebrospinal fluid from patients with recent epileptic seizures. **Epilepsy research**, v. 31, n. 2, p. 129–33, jul. 1998. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714504>. Acesso em: 23 mar. 2022.

POLETAEVA, I. I.; SURINA, N. M.; KOSTINA, Z. A.; PEREPELKINA, O. V.; FEDOTOVA, I. B. The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65years. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 71, n. Pt B, p. 130–141, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.072>. RAVIZZA, T.; GAGLIARDI, B.; NOÉ, F.; BOER, K.; ARONICA, E.; VEZZANI, A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of disease**, v. 29, n. 1, p. 142–60, jan. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17931873.

ROBERTS, D. S.; RAOL, Y. H.; BANDYOPADHYAY, S.; LUND, I. V.; BUDRECK, E. C.; PASSINI, M. A.; WOLFE, J. H.; BROOKS-KAYAL, A. R.; RUSSEK, S. J. Egr3 stimulation of GABRA4 promoter activity as a mechanism for seizure-induced up-regulation of GABAA receptor _4 subunit expression.v. 102, n. 33, p. 11894–11899, 2005.

ROSS, K. C.; COLEMAN, J. R. Audiogenic seizures in the developmentally primed Long-Evans rat. **Developmental psychobiology**, v. 34, n. 4, p. 303–13, maio 1999. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10331154>.

ROSS, K. C.; COLEMAN, J. R. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 24, n. 6, p. 639–53, ago. 2000. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10940439/>.

SHINOZAKI, H.; KONISHI, S. Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones. **Brain Research**, v. 24, n. 2, p. 368–371, 1970a. Disponível em: ">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5490301/>.

SHINOZAKI, H.; KONISHI, S. Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones. **Brain research**, v. 24, n. 2, p. 368–71, 1 dez. 1970b. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20868357>.

SOLTANI KHABOUSHAN, A.; YAZDANPANAH, N.; REZAEI, N. Neuroinflammation and Proinflammatory Cytokines in Epileptogenesis. **Molecular neurobiology**, v. 59, n. 3, p. 1724–1743, 1 mar. 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-022-02725-6>.

SOUZA, A. H. Liga Brasileira de Epilepsia.2022. Disponível em: https://www.epilepsia.org.br/mitos-verdades>.

TILELLI, C. Q.; FURTADO, M. D. A.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; ARISI, G. M.; ANDRADE-VALENÇA, L.; LEITE, J. P.; GARCIA-CAIRASCO, N. O estudo das epilepsias: uma ferramenta para as neurociencias. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 9, n. 3, p. 173–180, 2003. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/286725947_>.

TOURTELLOTTE, W. G.; MILBRANDT, J. Sensory ataxia and muscle spindle agenesis in mice lacking the transcription factor Egr3. **Nature genetics**, v. 20, n. 1, p. 87–91, set. 1998. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9731539. TREIMAN, D. M. GABAergic Mechanisms in Epilepsy. **Epilepsia**, v. 42, p. 8–12, 20 dez. 2001. Disponível em: ">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1528-1157.2001.042suppl.3008.x>.

TRINKA, E.; COCK, H.; HESDORFFER, D.; ROSSETTI, A. O.; SCHEFFER, I. E.; SHINNAR, S.; SHORVON, S.; LOWENSTEIN, D. H. A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. **Epilepsia**, v. 56, n. 10, p. 1515–23, out. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.13121>.

VAN GASSEN, K. L. I.; HESSEL, E. V. S.; RAMAKERS, G. M. J.; NOTENBOOM, R. G. E.; WOLTERINK-DONSELAAR, I. G.; BRAKKEE, J. H.; GODSCHALK, T. C.; QIAO, X.; SPRUIJT, B. M.; VAN NIEUWENHUIZEN, O.; DE GRAAN, P. N. E. Characterization of febrile seizures and febrile seizure susceptibility in mouse inbred strains. **Genes, brain, and behavior**, v. 7, n. 5, p. 578–86, jul. 2008. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-183X.2008.00393.x. Acesso em: 3 maio. 2022.

VEZZANI, A.; FRIEDMAN, A. Brain inflammation as a biomarker in epilepsy. **Biomarkers in medicine**, v. 5, n. 5, p. 607–14, out. 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3625731/pdf/nihms453256.pdf>.

VIEIRA, G. D. D.; SOUSA, C. M. de. Aspectos celulares e fisiológicos da Barreira Hematoencefálica. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 166, 19 dez. 2013. Disponível em: https://periodicos.unichristus.edu.br/jhbs/article/view/38>.

WALKER, A. E. CONVULSIVE FACTOR IN COMMERCIAL PENICILLIN. Archives of Surgery, v. 50, n. 2, p. 69, 1 fev. 1945. Disponível em: https://jamanetwork.com/journals/jamasurgery/article-abstract/546892>.

WALTON, N. Y.; TREIMAN, D. M. Experimental secondarily generalized convulsive status epilepticus induced by D,L-homocysteine thiolactone. **Epilepsy research**, v. 2, n. 2, p. 79–86, 1988. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3197690/>.

WORLD Health Orgnaization [www.who.int/]. Genebra: WHO, 2022.

WU, X. R.; LIN, P. X. Effects of cholecystokinin octapeptide on genetically determined seizure susceptibility. **Chinese medical journal**, v. 105, n. 2, p. 110–5, fev. 1992. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1597069/>.

ZHAO, D. Y.; WU, X. R.; PEI, Y. Q.; ZUO, Q. H. Kindling phenomenon of hyperthermic seizures in the epilepsy-prone versus the epilepsy-resistant rat. **Brain research**, v. 358, n. 1–2, p. 390–3, 9 dez. 1985. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4075129>.

REFERÊNCIAS DA INTERNET

<http://www.informatics.jax.org/>, 2022. Acessado por último em Junho. <https://www.epilepsia.org.br/> , 2022. Acessado por último em Julho. <https://www.ilae.org/>, 2002. Acessado por último em Julho.