

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM PATOLOGIA  
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA POPULAÇÃO  
ASTROCITÁRIA E MICROGLIAL DE CAMUNDONGOS  
TREMOR, UM MODELO MURINO DE CONVULSÕES  
AUDIOGÊNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista-UNIP, para obtenção do título de mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

**CATHARINA ANDRADE FRÓES SERRA  
TOLEDO PERES RODRIGUES**

**SÃO PAULO**

**2022**

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM PATOLOGIA  
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA POPULAÇÃO  
ASTROCITÁRIA E MICROGLIAL DE CAMUNDONGOS  
TREMOR, UM MODELO MURINO DE CONVULSÕES  
AUDIOGÊNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista-UNIP, para obtenção do título de mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan

**CATHARINA ANDRADE FRÓES SERRA  
TOLEDO PERES RODRIGUES**

**SÃO PAULO**

**2022**

Rodrigues, Catharina Andrade Fróes Serra Toledo Peres.  
Análise morfométrica da população astrocitária e microglial  
de camundongos tremor, um modelo murino de convulsões  
audiogênicas / Catharina Andrade Fróes Serra Toledo Peres  
Rodrigues. - 2022.

34 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da  
Universidade Paulista, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

1. GFAP. 2. Cromossomo 14. 3. Tremor. 4. Iba-1. I. Bondan,  
Eduardo Fernandes (orientador). II. Título.

**CATHARINA ANDRADE FRÓES SERRA  
TOLEDO PERES RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA POPULAÇÃO  
ASTROCITÁRIA E MICROGLIAL DE CAMUNDONGOS  
TREMOR, UM MODELO MURINO DE CONVULSÕES  
AUDIOGÊNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista-UNIP, para obtenção do título de mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan  
Universidade Paulista – UNIP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Fátima Monteiro Martins  
Universidade Paulista – UNIP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Pugliesi da Silva  
Centro Universitário São Camilo

## DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação ao meu marido Renan, que foi o primeiro a me incentivar a realizar essa pós-graduação, me mostrando a importância de evoluir e não mediu esforços para que eu conseguisse cumprir até o fim, sempre acreditando no meu potencial.

Dedico também a minha filha Maria Aurora, que nasceu quando iniciei a pós-graduação e me acompanhou em todos os momentos. Que um dia você possa acreditar que a ciência tem muito a evoluir e você pode fazer a diferença, se quiser.

Por fim dedico à minha mãe Priscila e minha vó Maria Aparecida, que sempre acreditaram que eu era capaz. Espero ter dado orgulho a vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir conseguir terminar essa dissertação até o fim.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan, por ter me aceito como sua orientada e, com toda sua paciência e sabedoria, pôde transmitir os seus conhecimentos.

Agradeço à Profa. Dra. Maria Martha Bernardi, por ter cedido amostras essenciais para minha pesquisa.

Agradeço à Profa. Dra. Cláudia Mori e à Dra. Mariana Gomes, por terem me apresentado os camundongos *tremor* e cedido seu material para que pudesse complementar essa pesquisa.

Por fim, agradeço à Universidade Paulista (UNIP), à CAPES e à Universidade de São Paulo pelo incentivo às pesquisas, em especial a esta.

## RESUMO

O tremor é uma desordem de movimento frequentemente encontrada na prática clínica e associada a numerosas disfunções neurológicas motoras. Pelo fato de muitas doenças neurodegenerativas que acometem o homem apresentarem mecanismos muitas vezes desconhecidos, modelos animais são de grande interesse para a identificação dos mecanismos envolvidos em sua patogênese e eventuais genes associados. Uma mutação autossômica recessiva espontânea no cromossomo 14 foi identificada em uma colônia de camundongos Swiss-Webster da Universidade de São Paulo, os quais apresentavam, a partir de 3 semanas, tremores, ataxia e convulsões tônicas audiogênicas, com piora observada ao envelhecimento. Muito embora estudos comportamentais e neuroquímicos tenham sido realizados em tais animais, denominados tremor, possíveis alterações morfológicas não foram devidamente caracterizadas. É reconhecido que as células gliais têm participação na sobrevivência e funcionamento dos neurônios envolvidos na motricidade. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo é o de investigar a população astrocitária e microglial dos animais tremor. Para tal, encéfalos foram coletados e submetidos às técnicas de coloração de hematoxilina-eosina e de *luxol fast blue* (para mielina), bem como marcação imunohistoquímica para os marcadores GFAP para astrócitos e Iba-1 para micróglia no hipotálamo e no hipocampo (áreas CA1, CA2 e CA3). A análise morfométrica foi realizada com uso do software Image Pro-Plus 6. Os índices astrocitário e microglial por área foram determinados, indicando a proporção da área marcada em relação à área total da imagem, sendo 0 a completa ausência de marcação e, 1, a marcação total da área. Na análise por microscopia de luz, não houve qualquer evidência de perda neuronal ou mielínica. Após investigação morfométrica, constatou-se que, na área CA1 do hipocampo, os camundongos do grupo tremor apresentaram menor expressão astrocitária de GFAP em relação aos animais controles. No entanto, não foi observada diferença entre os grupos em relação à expressão de GFAP no hipotálamo e nas áreas hipocâmpais CA2 e CA3, bem como para o marcador microglial Iba-1 nas 3 áreas hipocâmpais estudadas.

**Palavras-chave:** Tremor. Doenças neurodegenerativas. Cromossomo 14. GFAP. Iba-1.

## ABSTRACT

Tremor is a movement disorder frequently encountered in clinical practice and associated with numerous motor neurological disorders. Because many neurodegenerative diseases that affect humans have mechanisms that are often unknown, animal models are of great interest for identifying the mechanisms involved in their pathogenesis and possible associated genes. A spontaneous autosomal recessive mutation on chromosome 14 was identified in a colony of Swiss-Webster mice from the University of São Paulo, which presented, from 3 weeks of age, tremors, ataxia and audiogenic tonic seizures, with worsening observed with aging. Although behavioral and neurochemical studies have been carried out in such animals, called tremor, possible morphological changes have not been properly characterized. It is recognized that glial cells participate in the survival and functioning of neurons involved in motricity. In this context, the objective of the present study is to investigate the astrocytic and microglial population of tremor animals. For this purpose, brains were collected and submitted to hematoxylin-eosin and luxol fast blue staining techniques (for myelin), as well as immunohistochemical staining for GFAP markers for astrocytes and Iba-1 for microglia in the hypothalamus and hippocampus areas (CA1, CA2 and CA3). Morphometric analysis was performed using the Image Pro-Plus 6 software. Astrocytic and microglial indices per area were determined, indicating the proportion of the marked area in relation to the total area of the image, with 0 being complete absence of demarcation and 1 being total staining of the area. By light microscopy analysis, there was no evidence of neuronal or myelin loss. After morphometric investigation, it was found that, in the CA1 area of the hippocampus, mice in the tremor group had lower astrocytic expression of GFAP compared to control animals. However, no difference was observed between groups regarding the expression of GFAP in the hypothalamus and in the hippocampal areas CA2 and CA3, as well as for the microglial marker Iba-1 in the 3 hippocampal areas studied.

**Keywords:** Tremor. Neurodegenerative diseases. Chromosome 14. GFAP. Iba-1.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Expressão astrocitária de GFAP nas áreas hipocampais CA1, CA2 e CA3 dos grupos tremor e controle. ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. \*\*\*\* p < 0,0001. .... 19
- Figura 2 – Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica para GFAP nas áreas CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de camundongos controle e camundongos tremor. Objetiva: 40 x. .... 20
- Figura 3 – Expressão microglial de Iba-1 nas áreas hipocampais CA1, CA2 e CA3 dos grupos tremor e controle. ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. .... 21
- Figura 4 – Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica para Iba-1 nas áreas CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de camundongos controle e camundongos tremor. Objetiva: 40 x. .... 22
- Figura 5 – Expressão astrocitária de GFAP no hipotálamo dos grupos tremor e controle. ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. .... 23
- Figura 6 – Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica para GFAP no hipotálamo de camundongos controle e camundongos tremor. Objetiva: 40 x. .... 23

## LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
CSF1	Fator estimulante de colônias de macrófagos
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-di-hidroxifenil-acético
EGR	Fator de transcrição de resposta de crescimento precoce ( <i>Early growth response</i> )
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABRA1	Subunidade alfa-1 do receptor do ácido gama-aminobutírico tipo A
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GS	Glutamina sintetase
HE	Hematoxilina-eosina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HVA	Ácido homovanílico
Iba-1	Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1
IEGS	Genes precoces imediatos
LDH	Lactato desidrogenase
NG2	Polidendrócitos
NOR	Noradrenalina
SNC	Sistema nervoso central
TGF beta	Fator de crescimento transformante beta
VMA	Ácido vanililmandélico
5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindol acético

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	MATERIAL E MÉTODO .....	17
2.1	Processamento de material .....	17
2.2	Análise estatística.....	18
3	RESULTADOS .....	19
4	DISCUSSÃO.....	24
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
	REFERÊNCIAS .....	31

## 1 INTRODUÇÃO

A crise epiléptica é uma manifestação clínica transitória devido a disparos anormais, rítmicos, sincronizados e desordenados de populações de neurônios (TRINKA *et al.*, 2015). É considerada um distúrbio complexo em seus aspectos cognitivos, comportamentais, eletrofisiológicos, moleculares e em sua etiologia (LÓPEZ, 2015). Em 2013, a Força Tarefa da Liga Internacional Contra a Epilepsia definiu a epilepsia como duas crises não provocadas em um período de 24 horas (FISHER *et al.*, 2014). Aproximadamente 50 milhões de pessoas apresentam diferentes tipos de crises epiléticas (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

A etiologia de crise epiléptica é classificada em duas categorias: sintomática e idiopática (PACK, 2019). A crise epiléptica sintomática pode ser o resultado de uma lesão intracraniana (decorrente de qualquer lesão encefálica) ou pode ser causada por uma lesão extracraniana. Nos casos em que há a recorrência de crises epiléticas e ausência de lesão cerebral, utiliza-se o termo epilepsia idiopática (GESCHE *et al.*, 2019). Hoje, apesar do avanço na compreensão da etiologia da epilepsia, seu conhecimento ainda permanece limitado (LÓPEZ, 2015).

As crises epiléticas podem apresentar diferentes fases, tais como pródromo, aura, *ictus* e *pós-ictus* (REE; WIJNBERG, 2014; ASADI-POOYA; FARAZDAGHI, 2021).

O pródromo pode ser perceptível horas ou dias antes da crise, sendo muitas vezes reconhecido por mudanças de comportamento (tais como inquietação ou ansiedade) (REE; WIJNBERG, 2014). Aura é o período imediato (minutos ou segundos) antes do início da crise (ASADI-POOYA; FARAZDAGHI, 2021). *Ictus* é o período da crise propriamente dita, durando apenas alguns minutos, enquanto o *interictus* é o período entre as crises epiléticas. O *pós-ictus* é um período que decorre logo após o término da crise e pode durar de minutos a horas (MULA; MONACO, 2011).

Em 2010, a epilepsia foi classificada novamente, incluindo, no entanto, alguns tipos de epilepsia com início parcial ou generalizado. As crises parciais se originam a partir de um neurônio (podendo ser localizada ou em uma rede mais ampla); em comparação, as crises generalizadas se originam em algum ponto cerebral ampliando-se para as redes vizinhas (PACK, 2019).

Em 1940, foi descoberto que ratos possuem uma certa sensibilidade comportamental a sons de altas frequências, causando um estado de excitação tamanha a ponto de levá-los a uma corrida sem direção, culminando na crise convulsiva (SERIKAWA *et al.*, 2015).

Atualmente, existem oitenta e uma síndromes epiléticas diferentes em humanos devido mutações genéticas, no entanto, precisam ser detalhadas por meio de estudos em animais (SERIKAWA *et al.*, 2015). Não existe um único modelo animal para o estudo da epilepsia (pelo fato de as origens genéticas, manifestações clínicas e perfis farmacológicos serem diversos). Coelhos, gatos e cães são descritos como modelos convulsivos semelhantes aos humanos, capazes de convulsionarem mediante eletrochoque. Ainda assim, roedores são os modelos animais mais comumente aplicados para estudos de epilepsia, bem como de neurodesenvolvimento (FERRIER, 1873).

Segundo Serikawa *et al.* (2015), a clonagem de famílias multigeracionais que possuem epilepsia idiopática tem sido um sucesso, pois foi possível identificar, pelo sequenciamento de exoma e hibridização genômica comparativa, as causas das mutações genéticas em pacientes epiléticos.

Camundongos podem apresentar diversas mutações em apenas um gene que causa epilepsia e suas manifestações epiléticas estão diretamente correlacionadas a anormalidades do desenvolvimento do neocórtex, do hipocampo e outras áreas (DE LUCA, 2004). Em ratos geneticamente propensos à epilepsia, a linhagem do rato audiogênico Wistar se destaca por ser uma cepa que foi geneticamente modificada na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, a partir de 1990, sendo susceptível a convulsões (CAIRASCO, 1996; LÓPEZ, 2015).

Entre os modelos genéticos *in vivo*, as crises audiogênicas constituem um tipo de epilepsia muito utilizado experimentalmente, podendo ser desencadeadas por estimulação acústica de alta intensidade (LÓPEZ, 2015). As crises audiogênicas são classificadas como do tipo tônico-clônica generalizada, causadas pela hiperativação das áreas auditivas do tronco encefálico em resposta a um estímulo acústico de alta intensidade (LÓPEZ, 2015; DEUS *et al.*, 2020). Os substratos neurais dos roedores que apresentam essas crises incluem o colículo inferior, camadas profundas do colículo superior, alguns subnúcleos da formação reticular, a substância negra e a substância cinzenta periaquedutal (CAIRASCO *et al.*, 1996).

As crises tônico-clônicas são caracterizadas pela fase inicial tônica, na qual ocorre contração contínua de todos os músculos esqueléticos. A seguir, acontece a fase clônica, exibindo contrações rítmicas dessa musculatura (LÜDERS *et al.*, 1998).

Foi identificado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, uma colônia de camundongos Swiss Webster com três semanas de vida que apresentaram tremores, ataxia e incoordenação motora juntamente com crises audiogênicas. Esses animais foram denominados animais *tremor*.

O tremor é um movimento involuntário rítmico e oscilatório de uma ou várias regiões do corpo (URE *et al.*, 2016). Ele pode ser focal, afetando uma parte do corpo; segmentar, afetando duas ou mais partes do corpo; hemitremor, afetando um lado do corpo; e generalizado. A maior parte dos tipos de tremor está associada a descargas neuronais oscilatórias focais no encéfalo, incluindo cerebelo, tálamo e córtex cerebral (SAIFEE, 2019). O tremor fisiológico existe em todos os seres humanos, o que o diferencia é sua intensidade, capaz de levar ao tremor patológico que geralmente está associado a síndromes. Dentre os tremores patológicos, podemos citar o tremor de intenção, que está altamente relacionado com doenças cerebelares adquiridas, mas que também pode estar associado a uma condição genética. Uma síndrome incomum que está relacionada ao tremor é a ataxia espinocerebelar, que se apresenta como um tremor de repouso como parte de um fenótipo de parkinsonismo. O tremor pode ainda ser a característica principal de uma apresentação de ataxia, desenvolvendo-se mais tardiamente (URE *et al.*, 2016).

Após estudos genéticos realizados nos camundongos *tremor*, foi detectada mutação com padrão de herança autossômica recessiva no cromossomo 14 de uma ninhada, no intervalo 5 cM entre D14Miti37 (33,21 cM) e D14Miti15 (38,21 cM), tornando o gene *Egr3* o principal candidato dessa mutação (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

A plasticidade neuronal e a neurotransmissão são processos que se relacionam a uma complexa interação entre o controle da expressão gênica e estímulos. Os genes precoces imediatos (IEGs) são componentes dessa interação, sendo capazes de fornecer uma estrutura molecular para a rápida resposta frente à dinâmica da atividade neuronal, possibilitando uma adaptação por meio da expressão gênica. Além disso, participam da atividade neuronal na aprendizagem, na memória e na

sensibilidade de recompensa (DUCLOT; KABBAJ, 2017).

Além dos IEGs, o fator de transcrição de resposta de crescimento precoce 1 (*early growth response*, EGR 1) também participa da plasticidade sináptica e da atividade neuronal (DUCLOT; KABBAJ, 2017).

Os EGRs são uma importante família de fatores de transcrição, constituindo uma forma de resposta rápida e transitória de regulação gênica frente a distintos estímulos. Existem quatro tipos de genes EGR estruturalmente relacionados que codificam proteínas com domínio de ligação ao DNA de dedo de zinco (LIN *et al.*, 2007). Essa família pode ser classificada em EGR1, EGR2, EGR3 e EGR4 (PIO *et al.*, 2013). O EGR1 se liga na sequência do DNA 5'-GCG TGG GCG-3' (e similares como 5'-GCG GGG GCG-3'), sendo capaz de atuar na divisão e na diferenciação celular, bem como no processo de apoptose. Promotores que contêm uma sequência de ligação para EGR1 incluem a timidina, o fator de necrose tumoral, a sinaptofisina, a acetilcolinesterase e o receptor 1 de N-metil D-aspartato (NMDAR-1) que contém sítio de ligação para EGR1 (PIGNATELLI *et al.*, 2003).

O gene EGR2 foi descrito por codificar o ligante Fas (FasL), sendo regulado por linfócitos T CD4+ ativados. O EGR3, por sua vez, está envolvido no neurodesenvolvimento, na resposta imune e fibrinogênica (MORITA *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2017). Possui um papel essencial na aprendizagem e na memória por meio da regulação de genes-alvo efetores, que são necessários para aquisição da memória, bem como para sua consolidação ou recuperação. Além disso, é regulado positivamente pela atividade sináptica na amígdala e no córtex cerebral, sugerindo, assim, uma função na regulação da expressão gênica (LI *et al.*, 2007). Por fim, o EGR4 é um gene expresso em altos níveis no prosencéfalo, possuindo ainda importante papel na espermatogênese (TAEFEHSHOKR *et al.*, 2017). Dentre tais subdivisões, o EGR3 é o único capaz de atuar no sistema neural diferenciando neurônios simpáticos frente ao estresse ambiental por som, por manuseio ou diante de novas situações (PIO *et al.*, 2013).

Apesar da variabilidade entre espécies, sob condições normais, a neurogênese ocorre em regiões específicas do sistema nervoso central (SNC) de roedores e primatas, como na zona subventricular dos ventrículos laterais e na zona subgranular do giro dentado do hipocampo (MORRENS, 2012).

Particularmente, o neurotransmissor GABA ativa uma classe de receptores associados a canais de íons cloreto, conhecidos como receptores GABA<sub>A</sub>, que são altamente importantes para a transmissão sináptica inibitória no SNC (LEWIS *et al.*, 2010). Os canais de cloreto pentaméricos são montados usando 5 das 9 subunidades (alfa1-6, beta1-3, delta, epsilon, gama1-3, theta, pi e p1-3) (OLIVOTTO *et al.*, 2022). Acredita-se que os receptores com a subunidade delta possuam um papel importante na regulação da neurotransmissão por inibição tônica (LEWIS *et al.*, 2010). É certo que algumas variações dos genes que codificam o receptor GABA<sub>A</sub> e suas subunidades têm sido associadas a determinados tipos de epilepsia. Por exemplo, mutações no gene GABRA1 e GABRA6, que codificam a subunidade alfa 1 e alfa 6, foram identificadas com padrão de herança autossômica dominante na epilepsia mioclônica juvenil, na epilepsia de ausência na infância e na epilepsia infantil de espasmos. Os receptores GABA incluem os receptores ionotrópicos (GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub>) e metabotrópicos (GABA<sub>B</sub>) (HIROSE, 2014).

Além de células neuronais, o SNC é composto por uma ampla variedade de células gliais (FREEMAN, 2010).

Durante a embriogênese, as células da crista neural dão origem às primeiras células da glia que se alojam entre os neurônios, à medida que se espalham para estabelecer ligações entre o SNC e o restante do corpo (JESSEN; MIRSKY, 2005). As células da glia constituem a maior parte das células do sistema nervoso (VIVANCOS *et al.*, 2015). Algumas delas, inclusive, são capazes de funcionar como células imunes inatas no SNC, contribuindo, assim, para a homeostase corporal (YANG, 2018). No neurodesenvolvimento, as células gliais facilitam a interação entre neurônios e induzem alterações sinápticas, liberando gliotransmissores, como GABA, glutamato e citocinas, que afetam os neurônios de forma direta ou indireta (KIM *et al.*, 2020).

Muito embora as células gliais sejam classificadas em múltiplos tipos, como células de Schwann, micróglia, astrócitos, oligodendrócitos, células endimárias, células NG2 (polidendrócitos, capazes de originar astrócitos ou neurônios) e tanócitos. No presente estudo, foca-se especificamente nas populações astrocitária e microglial (MOREENS *et al.*, 2012). Juntas, todas essas células realizam uma enorme dinâmica de funções essenciais para o desenvolvimento fisiológico do sistema nervoso (FREEMAN, 2010).



Os astrócitos são as células gliais mais abundantes (estima-se que eles constituam cerca de 25% do volume do SNC), com a população mais diversa fenotipicamente, desempenhando um papel importante no desenvolvimento neural (MORRENS, 2012; JURGA *et al.*, 2021). Distribuem-se pelas substâncias cinzenta e branca do SNC, envolvendo vasos sanguíneos, neurônios e sinapses (HOL; PEKNY, 2015). A excelência multitarefa dos astrócitos é ressaltada pelo fato de que apenas uma célula pode envolver de 100 mil a 2 milhões de sinapses (conforme mensurado em roedores e humanos) (JURGA *et al.*, 2021). Em locais específicos do SNC, os astrócitos funcionam como progenitores neurais, produzindo novos astrócitos e neurônios (HOL; PEKNY, 2015; FREEMAN, 2016) e instruindo células precursoras a produzir a progênie neuronal (MORRENS *et al.*, 2012). Além disso, os astrócitos desempenham um papel essencial na defesa antioxidante do SNC, sendo capazes de fornecer substrato antioxidante (como a glutatona) para os neurônios (PEKNY; NILSSON, 2005). São indispensáveis na regulação das concentrações iônicas e de neurotransmissores, bem como para a homeostase energética. Os astrócitos expressam 10 isoformas diferentes de proteína glial fibrilar ácida (GFAP), além de vimentina, nestina e sinemina (HOL; PEKNY, 2015).

A proteína marcadora estrutural astrocitária é a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que está presente na maior parte dos astrócitos no SNC (JURGA *et al.*, 2021). A GFAP é uma proteína tipo III de filamento intermediário, podendo ser encontrada em diferentes isoformas (sua isoforma mais abundante em humanos é a alfa; em roedores, é a beta). Sabe-se que sua função é a de modular a forma e a motilidade dos astrócitos juntamente com outras proteínas do citoesqueleto (BONDAN *et al.*, 2017), além de desempenhar um papel importante no transporte do glutamato e na mitose (HOL; PEKNY, 2015). Sua expressão é regulada por fatores de transcrição e sinalização mediada por citocinas e pela atividade neuronal (devido a alterações de íons extracelulares e níveis de moléculas bioativas). Em convulsões, o incremento da atividade neuronal pode elevar o nível extracelular de potássio, conseqüentemente estimulando a atividade astrocitária e a expressão de GFAP (LI *et al.*, 2019).

A micróglia, por sua vez, representa cerca de 10 a 15% de todas as células gliais, sendo constituída pelos macrófagos residentes do tecido neural e podendo ser considerada também como as células imunes inatas do SNC (NAYAK, 2014; HANSEN, 2018). Em camundongos, as células da micróglia se originam de células

progenitoras eritromieloides no saco vitelínico embrionário e, posteriormente, migram para o encéfalo, onde se distribuem e se ramificam por todo o parênquima do SNC. Curiosamente, a micróglia está presente no SNC antes da vasculogênese do indivíduo (NAYAK, 2014), moldando os conjuntos neuronais, a plasticidade sináptica e a poda sináptica sob condições fisiológicas (SANAGI *et al.*, 2019). Sua homeostase e auto-renovação ocorre pela sinalização induzida pelo fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e do fator estimulante de colônias de macrófagos (CSF1) (HANSEN, 2018). A micróglia também está presente na neuroinflamação, seja de forma aguda ou crônica, tendo como resposta a microgliose (aumento da densidade celular) (IBANEZ *et al.*, 2019). Ao detectar fatores gerados por lesão parenquimatosa ou por infecções, a micróglia sofre transformações morfológicas e responde rapidamente se ramificando e se transformando de um estado de repouso para um estado ativo, liberando então citocinas e, assim, se tornando fagocítica (OHSAWA *et al.*, 2004). Dentre os marcadores usados para estudar a micróglia, a molécula adaptadora 1 de ligação ao cálcio ionizado (Iba-1) é o marcador mais utilizado, sendo uma proteína cuja expressão é restrita à micróglia e aos macrófagos (OHSAWA *et al.*, 2004).

A expressão de Iba-1 é intensificada na micróglia após axotomia, isquemia e agressões diversas ao tecido nervoso. A Iba-1 se localiza com a actina filamentosa em dobras membranosas principalmente durante atividade fagocítica e tem sido relatada como uma molécula-chave na fagocitose, além de estar envolvida nas vias de sinalização do cálcio (que é um componente essencial na reorganização da actina (OHSAWA *et al.*, 2004). Após macrófagos hematógenos terem contato com a Iba-1 microglial, podem adquirir características moleculares e morfológicas semelhantes às da micróglia, sendo importante a análise de métodos capazes de diferenciar essas duas populações celulares (IBANEZ *et al.*, 2019). A micróglia pode se diferenciar dos macrófagos pela sua alta ramificação (NAYAK, 2014).

O objetivo do presente estudo foi o de investigar morfometricamente o hipocampo e o hipotálamo de camundongos tremor que apresentaram convulsões audiogênicas, bem como sua população astrocitária e microglial mediante marcação imuno-histoquímica para os respectivos marcadores GFAP e Iba-1.

## 2 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 40 animais, sendo 20 camundongos tremor (10 machos e 10 fêmeas) e 20 camundongos Wistar controle (10 machos e 10 fêmeas), com 10 a 12 semanas de vida. Ambos os grupos foram submetidos à estimulação acústica por meio de um processador ultrassônico de 130 Watts e uma frequência de 20 kHz. Esses animais foram colocados individualmente em um cilindro de *plexiglass* e deixados observando o ambiente durante 15 segundos. Após esse período, o processador ultrassônico foi ligado durante 1 minuto ou até o início de uma convulsão.

Após 7 dias os animais que apresentaram crises convulsivas receberam diazepam (0,5 mg/kg) por via subcutânea e, após 15 minutos, foram submetidos à estimulação acústica novamente. Os camundongos Wistar controles não apresentaram qualquer crise após a administração da medicação. Em comparação, os camundongos tremor continuaram apresentando crises convulsivas (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

### 2.1 Processamento de material

O material utilizado no presente estudo foi cedido pela Profa. Dra. Claudia Mori, do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, e protocolado no CEUA, sob número 4124150116, da Universidade de São Paulo.

Blocos de parafina de amostras de hipocampo e hipotálamo de camundongos tremor (n=20) e camundongos controles (n=20) foram processados para confecção de lâminas histológicas, submetidas posteriormente às colorações de hematoxilina-eosina (HE), *luxol fast blue* (para mielina) e marcação imuno-histoquímica para a GFAP astrocitária e para Iba-1 microglial.

A marcação imuno-histoquímica foi realizada utilizando o método de coloração em cadeia de polímeros conjugado (*chain polymer-conjugated staining method*) (DAKO EnVision System). Foram utilizados como anticorpos primários imunoglobulina anti-GFAP policlonal de coelho (1:200; Z033401, Dako, Glostrup, Dinamarca) e anti-Iba1 policlonal de coelho (1:100; GTX101495, GeneTex, Irvine, CA, USA), seguidos pelo kit EnVision (EnVision+ Kit, HRP/Rabbit/DAB+, K4011, Dako/Agilent, Santa

Clara, CA, USA).

A análise imuno-histoquímica do hipocampo foi realizada nas áreas CA1, CA2 e CA3, enquanto no hipotálamo a região escolhida foi a zona periventricular. Dez fotomicrografias de cada lâmina analisada foram feitas usando-se objetiva de 40x. A análise morfométrica dos cortes marcados por imuno-histoquímica foi realizada utilizando o *index per area* do software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, MA, EUA), que representa a proporção da área marcada em relação à área total da imagem, sendo 0, a completa ausência de marcação, e 1, a marcação total da área.

## **2.1 Análise estatística**

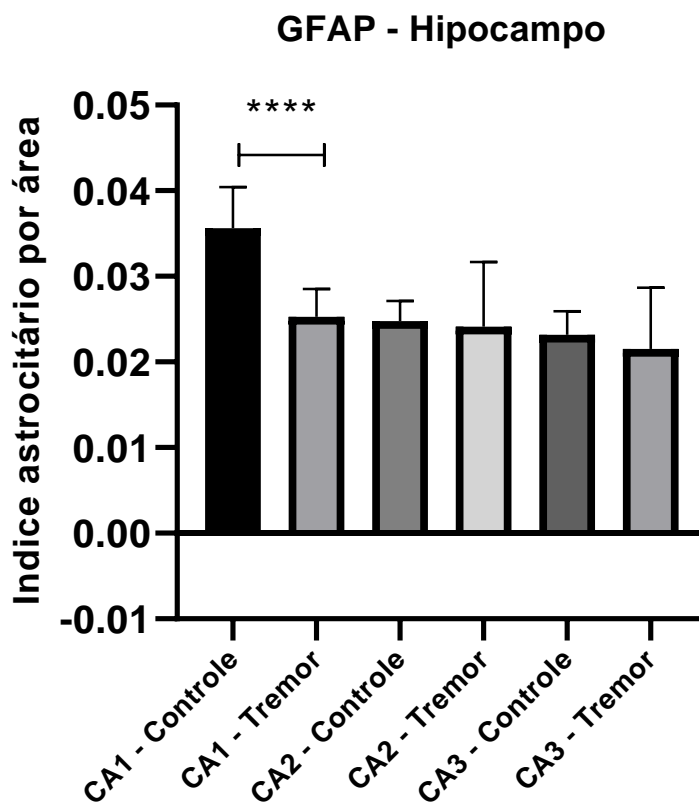
Os resultados do estudo morfométrico foram submetidos à análise estatística. A homocedasticidade foi verificada por meio do teste F ou teste de Bartlett. A normalidade foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey foi usada para analisar os dados morfométricos. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão e considerados significativos com  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas com o software Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

### 3 RESULTADOS

Em relação a observação dos cortes histológicos à microscopia de luz, não foi observado qualquer evidência de perda neuronal ou mielínica aparente entre os grupos de camundongos controle e tremor pelas técnicas de coloração de HE no hipotálamo e *luxol fast blue* no hipocampo.

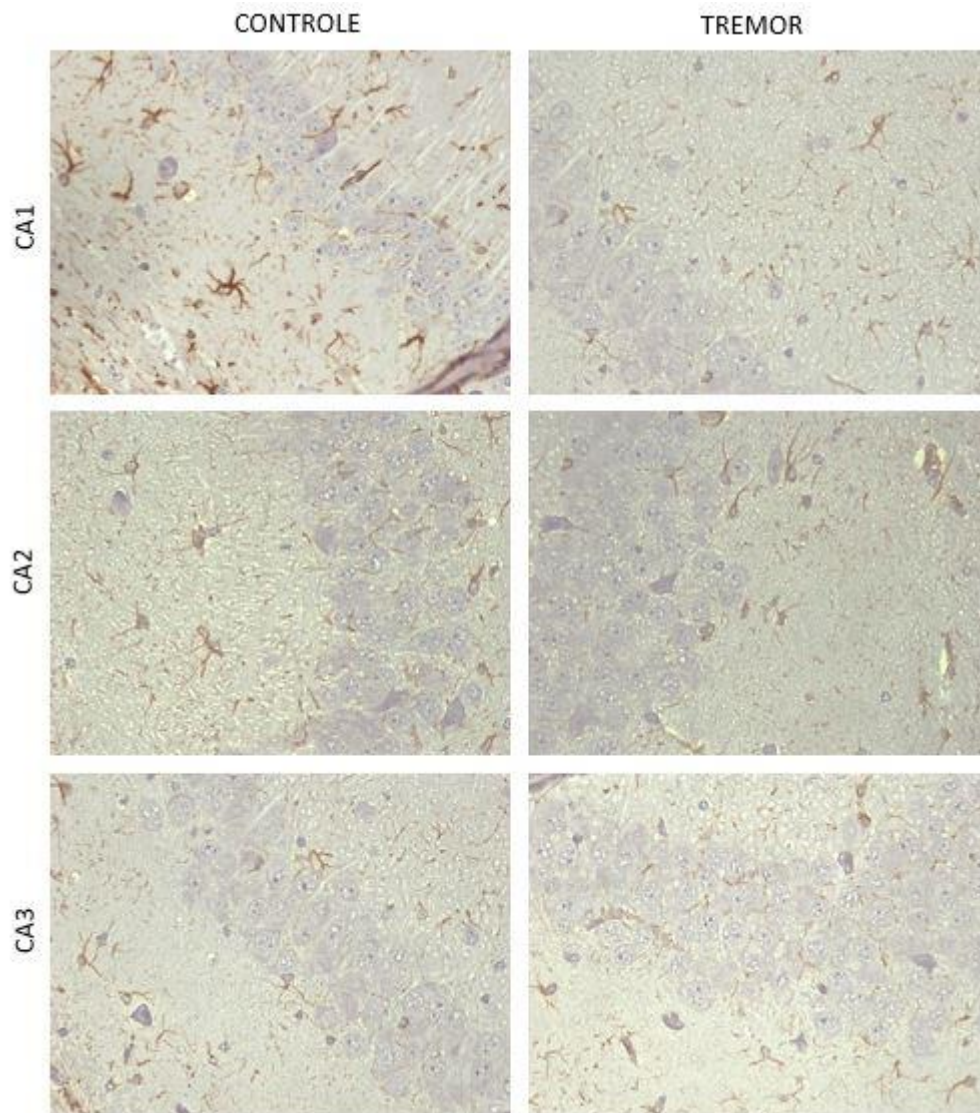
Após a investigação morfométrica, observou-se, a redução da expressão astrocitária de GFAP na área hipocampal CA1 do grupo tremor ( $p < 0,0001$ ) em relação aos camundongos controles (Figura 1). Não foi notada, porém, diferença entre os grupos tremor e controle em relação à expressão de GFAP nas áreas CA2 e CA3.

Figura 1 – Expressão astrocitária de GFAP nas áreas hipocampais CA1, CA2 e CA3 dos grupos tremor e controle. ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



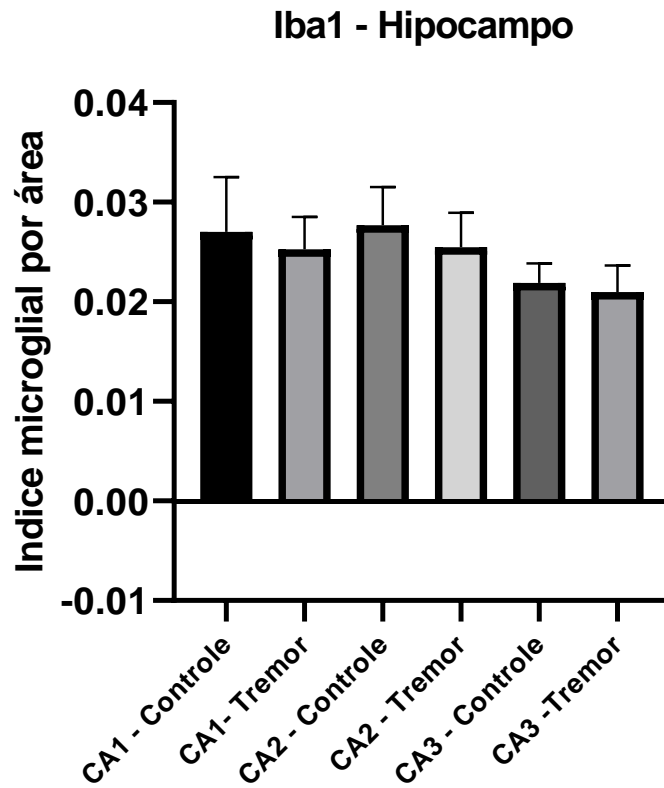
Fotomicrografias relativas à marcação imuno-histoquímica para a GFAP astrocitária nas áreas CA1, CA2 e CA3 dos grupos controle e tremor são apresentadas na Figura 2.

Figura 2 – Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica para GFAP nas áreas CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de camundongos controle e camundongos tremor. Objetiva: 40 x.



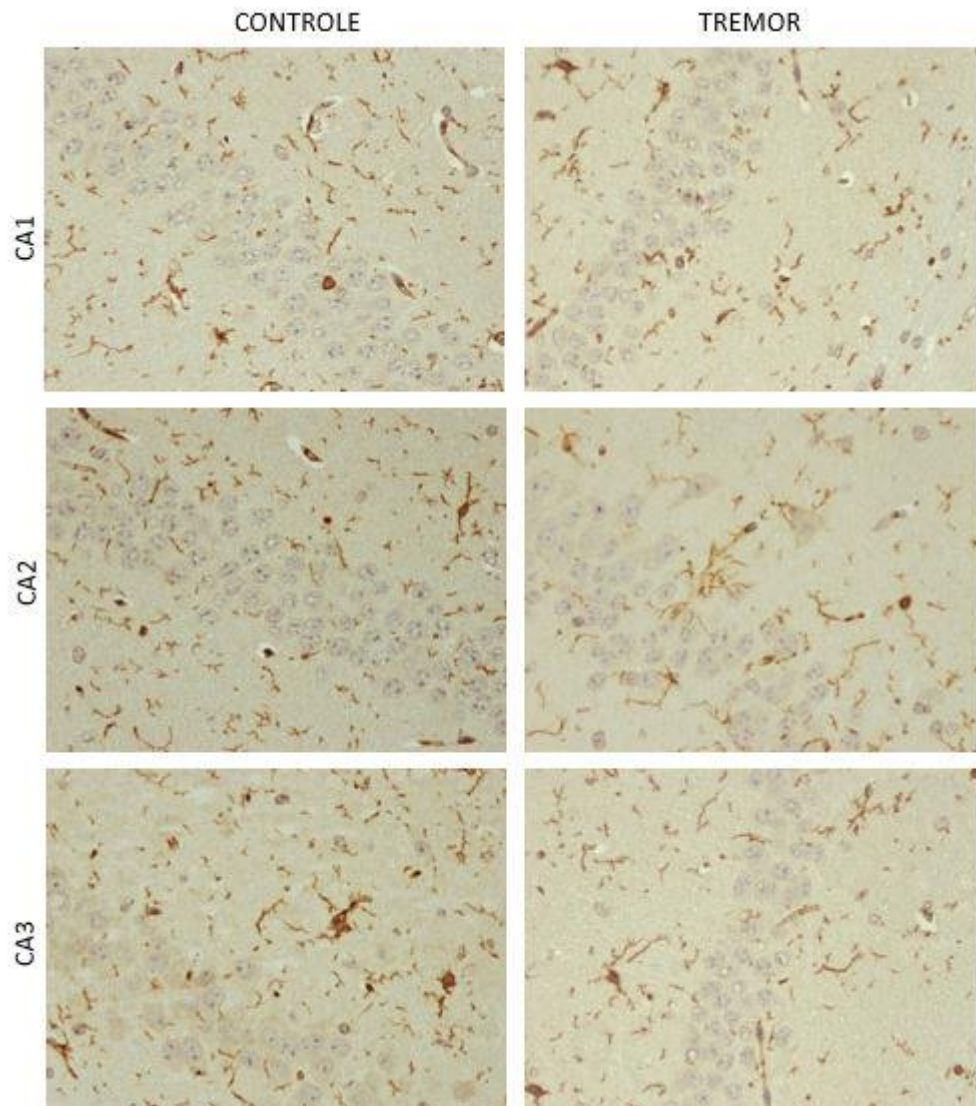
Também não foi encontrada diferença estatística significativa na expressão microglial de Iba-1 dentre as distintas áreas do hipocampo nos grupos tremor e controle (Figura 3).

Figura 3 – Expressão microglial de Iba-1 nas áreas hipocâmpais CA1, CA2 e CA3 dos grupos tremor e controle. ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.



Fotomicrografias relativas à marcação imuno-histoquímica de Iba-1 microglial na zona periventricular do hipotálamo nos grupos controle e tremor são mostradas na Figura 4.

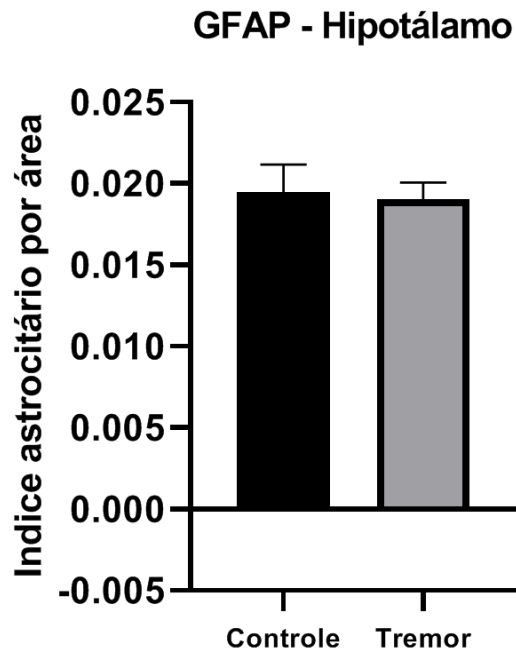
Figura 4 – Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica para Iba-1 nas áreas CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de camundongos controle e camundongos tremor. Objetiva: 40 x.



Não foi notada diferença estatística significativa na expressão astrocitária de GFAP no hipotálamo nos grupos tremor e controle (Figura 5).

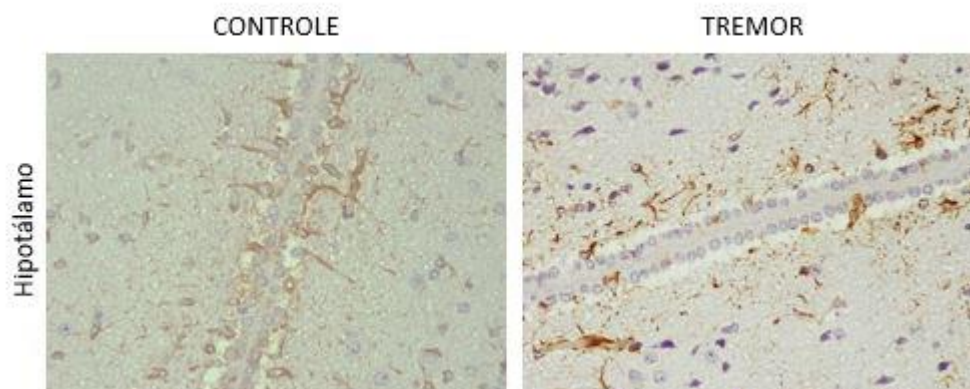


Figura 5 – Expressão astrocitária de GFAP no hipotálamo dos grupos tremor e controle. ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.



Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica para a GFAP no hipotálamo dos grupos controle e tremor são apresentadas na Figura 6.

Figura 6 – Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica para GFAP no hipotálamo de camundongos controle e camundongos tremor. Objetiva: 40 x.



## 4 DISCUSSÃO

Foi identificada uma colônia de camundongos Swiss-Webster no Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade de São Paulo, que, com 3 semanas de vida, apresentavam tremores, ataxia e convulsões audiogênicas, sendo então denominados como tremor. Posteriormente, foram selecionados para estudos genéticos e foi detectada uma mutação com padrão de herança autossômica recessiva no cromossomo 14, tendo como possível candidato o gene *Egr3*, um dos fatores de transcrição da família *zinc-finger* (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020). Foi demonstrado que o fator de transcrição EGR3 modula a expressão de receptores GABAérgicos no hipocampo, sendo que sua super-expressão foi relacionada com a susceptibilidade a convulsões audiogênicas em modelos animais. O EGR3 apresenta um importante papel no crescimento celular e no desenvolvimento neuronal, também atuando na regulação da plasticidade sináptica, ativação neuronal, aprendizado e memória. Além disso, está envolvido no desenvolvimento muscular, desenvolvimento de linfócitos, crescimento e migração de células endoteliais. Sua transcrição pode ocorrer de forma rápida e transitória, sendo induzida por diversos estímulos celulares ambientais, fisiológicos e patológicos (GARCIA-GOMES, 2020).

A caracterização do camundongo tremor se deu por uma sequência de testes comportamentais, avaliando seu desenvolvimento pós-natal, atividade geral, coordenação motora, comportamento exploratório, memória espacial e comportamento de enfrentamento (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

Na avaliação de desenvolvimento pós-natal, testes de desenvolvimento foram realizados a fim de se detectar se houve algum marcador precoce do fenótipo do camundongo mutante. No entanto, não foi observada qualquer alteração que permitisse diferenciar os camundongos tremor daqueles sem a mutação até três semanas de idade. A partir de três semanas de vida, foi possível observar que os camundongos tremor apresentavam um peso menor que os não mutantes (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

A avaliação do comportamento do fenótipo mutante foi realizada por meio do teste de campo aberto, a fim de avaliar o comportamento exploratório do animal e os níveis de atividade locomotora. O teste foi realizado em três e oito semanas de vida, constatando-se que os camundongos tremor apresentavam padrão reduzido em

relação à distância percorrida e à velocidade média em comparação com os animais controles (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

O teste de labirinto em T foi realizado a partir de nove semanas de vida, para avaliar se havia disfunção no hipocampo e na memória espacial, baseando-se na propensão natural dos roedores em alternar os lados do “T” em cada tentativa realizada. Neste teste os camundongos tremor e controle apresentaram um comportamento semelhante, com os machos apresentando pontuações mais elevadas em relação às fêmeas (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

O teste de natação forçada e o teste de suspensão da cauda foram realizados entre nove e dez semanas de vida, a fim de se analisar o comportamento de enfrentamento e sua função motora. No teste de natação forçada, o animal foi colocado individualmente em um cilindro de vidro vertical com água aquecida por 6 minutos, sendo então o animal removido do cilindro, seco e transferido para uma gaiola aquecida. Já no teste de suspensão da cauda, o animal foi suspenso pela cauda por uma fita presa a um gancho durante 6 minutos. Em ambos os testes, foi observado se o animal lutava ou se permanecia imóvel. Como resultado, tanto no teste de nado forçado como no teste de suspensão da cauda, os camundongos tremor obtiveram um maior tempo de imobilização comparado aos animais do grupo controle (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

Vinte camundongos tremor e vinte irmãos de ninhada (10 machos e 10 fêmeas em cada grupo), de dez a doze semanas de vida, foram utilizados para o teste de estimulação acústica. Os animais foram colocados em um cilindro de *plexiglass* e expostos a um processador ultrassônico de 160 Watts, com frequência de 20 kHz durante 60 segundos ou até iniciarem uma crise convulsiva. Após uma semana, os animais que apresentaram a crise convulsiva audiogênica foram medicados com diazepam (5 mg/kg, via subcutânea). Quinze minutos após a administração de diazepam, foram submetidos novamente ao estímulo acústico. Somente os camundongos tremor (100% das fêmeas e 80% dos machos), exibiram resposta a tal estimulação. Com apenas 1-2 segundos de estímulo, apresentaram uma corrida frenética monofásica, seguida de salto, queda atônica e crise convulsiva clônica generalizada (às vezes com rolamento do corpo durante 40 segundos). Durante o pós-*ictus*, permaneceram em decúbito ventral, com clônus e dispneia por 90-120 segundos. Já os camundongos do grupo controle medicados com diazepam não

apresentaram convulsão audiogênica durante o estímulo acústico (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

Os camundongos foram eutanasiados por decapitação com dez semanas de vida, sendo seus hipocampos dissecados e colocados em placa gelada. Por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), foram analisados os níveis de noradrenalina (NOR), ácido vanililmandélico (VMA), dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenil-acético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), 5-hidroxitriptamina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA), bem como o turnover de NOR, DA e 5-HT pela relação metabólito/neurotransmissor. O teor dos aminoácidos GABA, glutamato, glicina e aspartato foram igualmente determinados por HPLC. Observou-se que os camundongos mutantes apresentaram aumento significativo de GABA, glutamato, aspartato, NOR, 5-HT e 5HIAA em relação aos camundongos não mutantes. Em relação ao sistema dopaminérgico, DA e DOPAC não apresentaram diferenças entre os dois grupos (GARCIA-GOMES *et al.*, 2020).

Em nosso estudo, observou-se a diminuição da expressão astrocitária de GFAP na região CA1 do hipocampo dos camundongos tremor. É possível considerar que a redução da expressão de GFAP esteja relacionada diretamente com a diminuição da atividade metabólica dos astrócitos. Por sua vez, as demais regiões hipocampais analisadas (áreas CA2 e CA3) não diferiram em relação à marcação imunohistoquímica encontrada nos animais controles, tanto para a GFAP astrocitária quanto para a Iba-1 microglial. Igualmente não houve diferença quanto à expressão de GFAP entre camundongos mutantes e não mutantes na zona periventricular do hipotálamo.

Os astrócitos são as células gliais mais numerosas do SNC e são conhecidos por rapidamente responderem às alterações que ocorrem no SNC, podendo, assim, sofrer alterações morfológicas e funcionais que, por sua vez, afetam a atividade neuronal (BONDAN *et al.*, 2018). Os astrócitos podem influenciar a patogênese da epilepsia, uma vez que, por meio do controle homeostático, acabam regulando a transmissão sináptica, removendo neurotransmissores e liberando gliotransmissores, como, por exemplo, glutamato, ATP e D-serina. Durante a convulsão, o glutamato liberado pode estimular a glicólise e, conseqüentemente, a liberação astrocitária do produto glicolítico lactato. A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima fundamental essencial para a conversão do lactato captado por neurônios em piruvato, que é então metabolizado via ciclo do ácido tricarboxílico (BOISON; STEINHÄUSER, 2017). Pode-

se supor que uma diminuição da expressão astrocitária de GFAP, tal como encontrado na área CA1 do hipocampo, pode representar uma redução numérica e/ou de x atividade da população astrogliar nessa região.

O glutamato, é o neurotransmissor excitatório mais abundante no encéfalo e, por conta de seus efeitos neurotóxicos, é de suma importância que sua concentração seja precisamente regulada. Para que isso aconteça, a presença extracelular do glutamato deve ser rapidamente regulada pelos astrócitos mediante ação da enzima glutamina sintetase (GS) (FLANAGAN *et al.*, 2018). Uma possibilidade que justificaria o aumento do glutamato nos animais tremor seria justamente uma falha astrocitária quanto à remoção do excesso desse neurotransmissor. Isso faria com que a atividade enzimática da GS apresentasse uma deficiente ação de degradação de glutamato, o qual se acumularia no microambiente neural, acarretando em uma série de alterações funcionais e estruturais, inclusive quadros de epilepsia. Dado o reconhecido papel dos astrócitos na remoção do excesso de neurotransmissores das fendas sinápticas, a redução da atividade astrocitária na área CA1 do hipocampo poderia ser também aventada para explicar o aumento da concentração hipocampal das monoaminas NOR e 5-HT.

Um estudo revelou que os níveis de glutamato extracelular são maiores no encéfalo de animais epiléticos que nos não-epiléticos, assim como sua eliminação é também mais lenta nos primeiros (FLANAGAN *et al.*, 2018).

O aumento do GABA pode ser considerado um efeito compensatório do mecanismo inibitório na epilepsia, limitando, assim, a progressão e/ou disseminação da crise (MEURS *et al.*, 2008).

O hipocampo tem importante papel na aprendizagem, na formação da memória e na regulação das emoções, como no medo, na ansiedade e no estresse (BARTSCH; WULFF, 2015), sendo considerado um perfeito local para estudos experimentais de neuroplasticidade.

A neuroplasticidade é a capacidade de estruturas encefálicas se adaptarem e se reorganizarem perante estímulos intrínsecos ou extrínsecos. Pode ser classificada em vários níveis funcionais e estruturais, de acordo com a excitabilidade celular. O alto grau de neuroplasticidade do hipocampo pode particularmente vulnerabilizá-lo sob condições deletérias, como, por exemplo, na epilepsia, podendo levar a déficits cognitivos (BARTSCH; WULFF, 2015). Em nosso estudo, o hipocampo foi a região

especialmente escolhida para a análise morfométrica da população astrocitária e microglial por ter sido o local em que as alterações neuroquímicas foram encontradas nos camundongos tremor.

Múltiplas alterações no hipocampo do indivíduo epiléptico tornariam a rede neuronal hiperexcitável, provavelmente gerando a convulsão em resposta à excitabilidade aumentada durante situações de estresse (GUNN; BARAM, 2017). Nesse sentido, a diminuição da expressão astrocitária de GFAP na área hipocampal CA1 do presente estudo poderia representar uma causa para a descarga neuronal exibida pelos animais tremor diante de estímulos sonoros, uma vez que a menor recaptação de neurotransmissores por tais células gliais poderia gerar alterações neuroquímicas capazes de desencadear respostas elétricas aberrantes em determinadas redes neuronais. A diminuição astrociária pode levar a uma alteração funcional dos astrócitos e, assim, levar a uma maior excitabilidade neuronal, sendo provavelmente o estresse induzido por estímulos sonoros nos animais tremor o gatilho para a ocorrência das convulsões audiogênicas.

Pelo papel fundamental do hipotálamo na regulação da homeostase corporal, enviando sinais descendentes para o tronco encefálico e ascendentes para áreas superiores do prosencéfalo, telencéfalo e diencefalo, como a porção anterior do tálamo e regiões límbicas do córtex cerebral, bem como transmitindo estímulos hormonais e neurais para o infundíbulo hipotalâmico a fim de controlar as secreções da hipófise (BARBOSA *et al.*, 2017), o hipotálamo foi também considerado em nosso estudo da população glial nos animais tremor. Apesar de compreender menos de 2% do encéfalo, o hipotálamo está relacionado com importantes mecanismos ligados à termogênese, ao balanço hídrico e energético, à regulação do sistema nervoso autônomo e à reprodução, dentre várias outras funções. Suas porções caudais estão relacionadas aos recursos metabólicos adequados para comportamentos defensivos e exploratórios em resposta a mudanças repentinas diante de estímulos endógenos e exógenos (RASMUSSEN *et al.*, 2021). No entanto, não foram evidenciadas quaisquer diferenças nos animais tremor em relação à expressão astrocitária de GFAP no hipotálamo periventricular.

Mais estudos são necessários para uma melhor caracterização sobre os camundongos tremor. A eletroencefalografia pode ser um novo modelo para melhor entender a patogênese das epilepsias que ocorrem em convulsões clônicas

generalizadas.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos cortes histológicos dos camundongos tremor não demonstrou qualquer evidência de perda neuronal ou miélnica.

Após investigação morfométrica das amostras submetidas a marcação imunohistoquímica para a GFAP, observou-se que, na área CA1 do hipocampo, os animais do grupo tremor apresentaram menor expressão astrocitária dessa proteína em relação aos animais controles, sugerindo uma diminuição metabólica astrocitária.

Não foi notada, porém, diferença entre os grupos tremor e controle em relação à expressão de GFAP no hipotálamo e nas áreas hipocampais CA2 e CA3, bem como para o marcador microglial Iba-1 nas 3 áreas hipocampais estudadas.



## REFERÊNCIAS

- ASADI-POOYA, A. A.; FARAZDAGHI, M. Aura: epilepsy vs. functional (psychogenic) seizures. **Seizure**, v. 88, p. 53-55, 2021.
- BARBOSA, D. A. N.; SOUZA, R. O.; SANTO, F. M.; FARIA, A. C. O.; GORGULHO, A. A.; SALLES, A. A. F. The hypothalamus at the crossroads of psychopathology and neurosurgery. **Neurosurgical Focus**, v. 43, p. 1-11, 2017.
- BARTSCH, T.; WULFF, P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. **Neuroscience**, v. 309, p. 1-16, 2015.
- BOISON, D.; STEINHÄUSER, C. Epilepsy and astrocyte energy metabolism. **Glia**, v. 66, p. 1-9, 2017.
- BONDAN, E. F.; VIEIRA, C. C.; MARTINS, M. F. M. Curcumin decreases astrocytic reaction after gliotoxic injury in the rat brainstem. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 75, p. 546-552, 2017.
- BONDAN, E. F.; VIEIRA, C. C.; MARTINS, M. F. M.; KIRSTEN, T. B.; BERNARDI, M. M. Propentofylline decreases hypothalamic astrogliosis induced by hypercaloric diet in the rat. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 76, p. 252-256, 2018.
- CAIRASCO, N. G.; WAKARNATSU, H.; OLIVEIRA, A. C.; GOMES, E. L. T.; BEL, E. A. D.; MELLO, L. E. A. M. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy Research**, v. 26, p. 177-192, 1996.
- DEUS, J. L.; AMORIM, M. R.; FILHO, P. C. G. B.; OLIVEIRA, A.C.; BATALHÃO, M. E.; CAIRASCO, N. G.; CÁRNIO, E. C.; LEÃO, R. M.; BRANCO, L. G. S.; CUNHA, A. O. S. Inflammatory markers in the hippocampus after audiogenic kindlin. **Neuroscience Letters**, v. 721, p. 1-6, 2020.
- DE LUCA, G.; GIORGIO, R. M.; MACAIONE, S.; CALPONA, P. R.; COSTANTINO, S.; PAOLA, E. D.; SARRO, A.; CILIBERTO, G.; SARRO, G. Susceptibility to audiogenic seizure and neurotransmitter amino acid levels in different brain areas of IL-6-deficiente mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.78, p. 75-81, 2004.
- DUCLOT, F.; KABBAJ, M. The role of early growth response 1 (EGR1) in brain plasticity and neuropsychiatric disorders. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, p. 1-20, 2017.
- FERRIER, D. Experimental reasearches in cerebral physiology and pathology. **Journal of Anatomy and Physiology**, v.8, p. 152–155, 1873.
- FISHER, R.S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J. H.; ELGER, C. E.; JR, E. 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. A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, p. 475-482, 2014.

FLANAGAN, B.; MCDAID, L.; WADE, J.; WONG-LIN, K.; HARKIN, J. A computational study of astrocytic glutamate influence on post-synaptic neuronal excitability. **PLOS Computational Biology**, v. 14, p. 1-25, 2018.

FREEMAN, M. R. Specification and morphogenesis of astrocytes. **Science**, v. 330, p. 774-778, 2010.

GARCIA-GOMES, M.S.A.; ZANATTO, D.A.; ALONSO, O.Y.G.; 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.; 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**, v. 105, p. 1-10, 2020.

GUNN, B. G.; BARAM, T. Z. Stress and seizures: Space, time and hippocampal circuits. **Cell Press Reviews**, v. 40, p. 667-679, 2017.

GRONE, B. P.; BARABAN, S. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. **Nature Neuroscience**, v. 18, p. 1-5, 2015.

HANSEN, D. V.; HANSON, J. E.; SHENG, M. Microglia in Alzheimer's disease. **Journal of Cell Biology**, v. 217, p. 459-472, 2018.

HIROSE, S. Mutant GABAA receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy. **Progress in Brain Research**. v. 213, p. 55-85, 2014.

HOL, E. M.; PEKKNY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 32, p. 121-130, 2015.

IBANEZ, F. G.; PICARD, K.; BORDELAU, M.; SHARMA, K.; BISHT, K.; TREMBLAY, M. E. Immunofluorescence staining using IBA1 and TMEM119 for microglial density, morphology and peripheral myeloid cell infiltration analysis in mouse brain. **Journal of Visualized Experiments**, v.152, p.1-8, 2019.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. **Neuroscience**, v. 6, p. 671-682, 2005.

JURGA, A. M.; PALECZNA, M.; KADLUCZKA, J.; KUTER, K. Beyond the GFAP-astrocyte protein markers in the brain. **Biomolecules**, v. 11, p. 1-28, 2021.

KIM, Y. S.; CHOI, J.; YOON, B. E. Neuron-glia interactions in neurodevelopmental disorders. **Cells**, v. 9, p. 1-21, 2020.

LEWIS, R. W.; MABRY, J.; POLISAR, J. G.; EAGEN, K. P.; GANEM, B.; HESS, G. P. Dihydropyrimidinone positive modulation of delta subunit containing GABAA receptors, including an epilepsy-linked mutant variant. **Biochemistry**, v. 49, p. 4841-4851, 2010.

LI, D.; LIU, X.; LIU, T.; LIU, H.; TONG, L.; JIA, S. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. **Glia**, v. 68, p. 878-897, 2019.

LIN, L.; YUN, S.H.; KEBLESH, J.; TROMMER, B. L.; XIONG, H.; RADULOVIC, J.; TOURTELLOTTE, W.G. Egr3, a synaptic activity regulated transcription factor that is essential for learning and memory. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 35, p. 76-88, 2007.

LÓPEZ, D. L.; NIETO, R. G.; TURRIÓN, M. J. H.; CAIRASCO, N. G.; BENITO, D. S.; 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**, v. 71, p. 1-12, 2015.

LÜDERS, H.; ACHARYA, J.; BAUMGARTNER, C.; BENBADIS, S.; BLEASEL, A.; BURGESS, R.; DINNER, D. S.; EBNER, A.; FOLDVARY, N.; GELLER, E. HAMER, H.; HOLTHAUSEN, H.; KOTAGAL, P.; MORRIS, H.; MEENCKE, H. J.; NOACHTAR, S.; ROSENOW, F.; SAKAMOTO, A.; STEINHOFF, B. J.; TUXHORN, I.; WYLLIE, E. Semiological seizure classification. **Epilepsy**, v. 39, p. 1006-1013, 1998.

MEURS, A.; CLINCKERS, R.; EBINGER, G.; MICHOTTE, Y.; SMOLDERS, I. Seizure activity and changes in hippocampal extracellular glutamate, GABA, dopamine and serotonin. **Epilepsy Research**, v. 78, p. 50-59, 2008.

MORRENS, J.; BROECK, W. V. D.; KEMPERMANN, G. Glial cells in adult neurogenesis. **Glia**, v.60, 159-174, 2012.

MORITA, K.; OKAMURA, T.; SUMITOMO, S.; IWASAKI, Y.; FUJIO, K.; YAMAMOTO, K. Emerging roles of Egr2 and Egr3 in the control of systemic autoimmunity. **Rheumatology**, v. 55, p. 76-81, 2016.

MULA, M.; MONACO, F. Ictal and peri-ictal psychopathology. **Behavioural Neurology**, v. 24, p. 1-5, 2011.

NAYAK, D.; ROTH, T. L.; MCGAVERN, D. B.; Microglia development and function. **The Annual Review of Immunology**, v. 32, p. 367-402, 2014.

OLIVOTTO, S.; FREDDI, A.; LAVATELLI, R.; BASSO, E.; LEIDI, A.; CASTELLOTTI, B.; SPACCINI, L.; BOVA, S. M.; VEGGIOTTI, P. Successful use of perampanel in GABRA1-related myoclonic epilepsy with photosensitivity. **Epilepsy & Behavior Reports**, v.19, p. 1-4, 2022.

OHSAWA, K.; IMAI, Y.; SASAKI, Y.; KOHSAKA, S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fibrin and enhances its actin-bundling activity, **Journal of Neurochemistry**, v. 88, p. 844–856, 2004.

PACK, A. M. Epilepsy overview and revised classification of seizures and epilepsies. **Continuum Journal**, v. 25, p. 306-321, 2019.

PIGNATELLI, M.; LUNA-MEDINA, R.; PÉREZ-RENDÓN, A.; SANTOS, A.; PEREZ-CASTILLO, A. The transcription factor early growth response factor-1 (EGR-1) promotes apoptosis of neuroblastoma cells. **The Biochemical Journal**, v. 373, p. 739-746, 2003.

PIO, R.; ZHENYU, J.; BARON, V. T.; MERCOLA, D. Early Growth Response 3 (Egr3) Is highly over-expressed in non-relapsing prostate cancer but not in relapsing prostate cancer. **Plos One**, v. 8, p. 1-13, 2013.

REE, M. V. D.; WIJNBERG, I. A review on epilepsy in the horse and the potential of Ambulatory EEG as a diagnostic tool. **Veterinary Quarterly**, v.32, p.159-167, 2014.

RASMUSSEN, U.; EFFRAIMIDIS, G.; KLOSE, M. The hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT)-axis and its role in physiology and pathophysiology of other hypothalamus-pituitary functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 525, p. 1-12, 2021.  
SAIFEE, T. A. Tremor. **British Medical Bulletin**, v.130, p. 51-63, 2019.

SANAGI, T.; SASAKI, T.; NAKAGAKI, K.; MINAMIMOTO, T.; KOHSAKA, S.; ICHINOHE, N. Segmented Iba1-positive processes of microglia in autism model marmosets. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.13, p.1-8, 2019.

SHIN, H.; SEOL, D. W.; NAM, M.; SONG, H.; LEE, D. R.; LIM, H. J. Expression of Egr3 in mouse gonads and its localization and function in oocytes. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, p. 781-787, 2017.

SERIKAWA, T.; MASHIMO, T.; KURAMOTO, T.; VOIGT, B.; OHNO, Y.; SASA, M. Advances on genetic rat models of epilepsy. **Experimental Animals**, v. 64, p.1-2, 2015.

TAEFEHSHOKR, S.; KEY, Y.A.; KHAKPOUR, M.; DADEBIGHLU, P.; OVEISI, A. Early growth response 2 and Egr3 are unique regulators in immune system. **Central European Journal of Immunology**, v. 42, p. 205-209, 2017.

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, p. 1515-1523, 2015.

URE, R.; DHANJU, S.; LANG, A.; FASANO, A. Unusual tremor syndromes: know in order to recognize. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 87, p. 1191-1203, 2016.

VIVANCOS, T. G.; PINEDO, U. G.; GUIU, J. M. Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. **Neurologia**, v. 30, p. 119-129, 2015.

YANG, Q. Q.; ZHOU, J. W. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. **Glia**, v. 67, p. 1-19, 2018.