

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO

## **Trabalho de Conclusão de Curso**

Aluna: Suelen Baggio

Orientador: Diogo Onofre Gomes de Souza

Membro da Banca 1: Dra. Susana T. Wofchuk

Membro da Banca 2: Dr. Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre, 11 de julho de 2013.

## **Índice:**

Agradecimentos.....	3
Título.....	4
Resumo.....	4
Palavras-chave.....	4
Abreviações.....	4
1.Introdução.....	5
2.Materiais e Métodos.....	6
3.Resultados.....	9
4.Discussão.....	10
5.Conclusão.....	13
6.Figuras.....	14
7.Lendas.....	20
8.Referências.....	22

## **Agradecimentos:**

Gostaria de agradecer, primeiramente àqueles que sempre me apoiaram para que fosse possível chegar até aqui, minha família, meus pais e meu irmão... Amo muito vocês! O apoio de vocês foi fundamental para que eu pudesse superar os obstáculos que surgiram ao longo desta caminhada.

Ao Ben Hur Mussulini, por simplesmente ter mudado minha vida, tanto acadêmica, quanto sentimental, por ter dedicado tanto tempo a me ajudar e por me fazer feliz! Tu não fazes ideia do quanto é importante para mim e da felicidade que sinto em fazer parte da tua vida.

Ao Eduardo Pacheco Rico por ter auxiliado enormemente na construção deste trabalho e de muitas outras ideias e projetos que mudaram e mudarão minha trajetória.

Ao meu orientador Diogo Souza pelas tantas oportunidades que me forneceu, por todo apoio e alegria fornecidas diariamente a todos.

A todos aqueles que de uma forma ou outra me fizeram crescer ao longo destes anos acadêmicos, em especial a Luciana Calabro, o pessoal dos Laboratórios 24 e 28 do Departamento de Bioquímica, professores, colegas e amigos.

Agradeço a banca que aceitou o convite e se disponibilizou a engrandecer meu trabalho com boas ideias, Diogo Losch de Oliveira e Susana Wofchuk, que também foi uma grande orientadora e uma pessoa fantástica no tempo em que convivemos.

À UFRGS, pelo ensino de excelência e pelas muitas experiências vividas; aos órgãos de fomento pelo auxílio financeiro, em especial ao CNPq.

Por fim, agradeço a todos e a tudo que de uma forma ou outro me fizeram chegar até aqui!

## **Comparação comportamental do perfil convulsivo entre machos e fêmeas de *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto induzido por ácido caínico.**

Suelen Baggio<sup>a,\*</sup>, Eduardo Pacheco Rico<sup>a</sup>, Ben Hur Marins Mussulini<sup>a</sup>, Diogo Onofre G. de Souza<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

\* Autor correspondente.

### **Resumo**

Epilepsia é uma desordem neurológica que afeta 3% da população mundial, com 30% de pacientes refratários. O *zebrafish* surge como um modelo animal para novos estudos, que buscam melhor compreender as alterações comportamentais e fisiológicas, através da utilização de drogas pró-convulsivas. Considerando que hormônios gonadais podem influenciar na refratariedade, este estudo visa analisar o perfil convulsivo e comportamental no protocolo de convulsão induzida por ácido caínico, a partir da comparação entre machos e fêmeas. Foram observadas diferenças entre gêneros no desenvolvimento e manutenção das crises convulsivas, nos índices de mortalidade e na permanência em *status epilepticus*. Ao avaliar um perfil de recuperação, percebeu-se que animais convulsionados mantêm alterações em parâmetros de tempo e episódios de imobilidade em relação ao controle, e que em alguns casos a convulsão pode se manter por até 4 dias após a injeção, mas sem apontar diferença entre os gêneros.

Palavras-chave: convulsão; ácido caínico; *zebrafish*, gênero.

Abreviação: Ácido Caínico (AC).

**Observação: Este trabalho segue as normas do periódico *Epilepsy Research*.**

## **1.Introdução**

A epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada por crises convulsivas recorrentes e espontâneas, associadas com alterações comportamentais e neurobiológicas (Fisher et. al, 2005). Atinge em torno de 3% da população mundial, sendo tema de interesse de muitos pesquisadores desde tempos remotos. Os resultados mais contundentes foram e são obtidos através do uso de fármacos epileptogênicos, como pilocarpina, pentilenotetrazol (PTZ) e ácido caínico (AC), através da geração de perfis de escores comportamentais. Apesar dos avanços científicos obtidos, 30% dos pacientes afetados ainda permanecem refratários aos tratamentos desenvolvidos (Loscher, 2011).

Caso sejam analisados os trabalhos realizados até então, percebe-se que pouca atenção foi dada às diferenças que existem entre gêneros. Machos e fêmeas por vezes apresentam resultados diferentes quando submetidos aos mesmos protocolos, como em alguns estudos que mostram a capacidade neuroprotetora do estrógeno, diminuindo a intensidade das crises convulsivas e protegendo dos danos cerebrais (Morales, 2011). Ao mesmo tempo, outros resultados são mais complexos, mostrando que são muitos os fatores capazes de influenciar tais crises, como idade, nível hormonal e região cerebral envolvida (Velísková, 2006). Mesmo assim, as pesquisas realizadas têm focado em machos adultos ou ratas fêmeas ovariectomizadas e ignorado o fato de que estes representam apenas uma parcela da população e não o todo, o que pode ser uma das causas para a alta porcentagem de pacientes que não respondem aos tratamentos empregados. Além disso, têm-se o problema do modelo animal, centralizado no constante uso de roedores, ao passo que inúmeras alternativas surgem (Loscher and Schimidt, 2011).

Como boa opção, o *zebrafish* (*Danio rerio*) mostra-se um facilitador para estes estudos, já que apresenta baixos custos, fácil manutenção, necessidade de menores quantidades de fármacos e uma maior agilidade na obtenção de resultados propícios ao desenvolvimento de novas drogas, o que pode ser posteriormente transposto a modelos animais mais dispendiosos até chegar aos seres humanos. Trata-se de um pequeno teleósteo de água doce, que nos últimos tempos tem atingido posição de grande relevância na pesquisa biomédica, sendo considerado um modelo emergente de vertebrados em muitos campos científicos, inclusive para neurociências, onde tem sido utilizado em modelos de epilepsia. Em 2011, Alfaro et. al desenvolveram um protocolo de convulsão em *zebrafish* com AC, que busca expandir os conhecimentos pré-existentes sobre a epilepsia.

Outro ponto pouco abordado pela literatura é o período pós-ictal, sendo este definido como as manifestações anormais que ocorrem entre o fim de uma convulsão e o retorno ao comportamento habitual do indivíduo (Fischer and Engel Jr., 2010). Neste contexto, a tarefa comportamental de *open tank* (similar ao campo aberto para roedores), desenvolvida para avaliar o comportamento exploratório e locomotor do *zebrafish* (Rosemberg et al., 2011), poderia ser utilizada para acessar se há este período pós-ictal no modelo de indução de crise convulsiva por AC neste teleósteo.

Portanto, o objetivo deste estudo é fazer uma comparação entre machos e fêmeas, observando padrões convulsivos e o período pós-ictal em um modelo de convulsão induzida por AC em *zebrafish* adulto.

## **2. Material e Métodos:**

### *2.1 Animais*

Quarenta animais foram utilizados, 50% de fêmeas e 50% de machos, obtidos comercialmente de uma petshop local (Delphis), apresentando alta heterogeneidade

genética. Doze animais foram utilizados no experimento 1, mais doze animais no experimento 2 e dezesseis animais no experimento 3. Todos os animais eram maduros sexualmente, medindo em média 4 cm, e pesando entre 0,28 e 0,32 gramas. Foram aclimatados por duas semanas, em aquários de 25 litros, sendo separados por sexo para pesagem um dia antes da realização dos experimentos. Todos os tanques são mantidos com água de osmose reversa, adicionados de solução de sal marinho 18g/L Instant Ocean® e sob filtração mecânica e química a uma temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e pH entre 6,8 e 7,5 (ajustado com solução de bicarbonato 18g/L). A iluminação da sala é provida por lâmpadas fluorescentes com ciclo de claro/escuro de 14/10 horas, controladas por relógio digital (7:00 h - 21:00 h). Os animais são alimentados às 8:00 h com ração comercial (Alcon BASIC®, Alcon, Brasil), as 17:00 h os animais recebem artêmia criada em nosso próprio laboratório (alimentação padrão ouro). Todos os procedimentos estão de acordo com o projeto número CEP- 14652, aprovado por esta universidade.

### *2.2 Injeção de Ácido Cármico*

Previamente separados entre machos e fêmeas (50% para cada grupo), pelas diferenças morfológicas entre eles, através de uma análise cuidadosa dos experimentadores, os animais foram injetados intraperitonealmente ( i.p.) com uma dose de 5 mg/kg de AC ou (n=22), no caso dos animais controle (n=18), com uma solução de PBS. O volume da injeção era sempre de 10 uL. Para precisar-se tal volume, utilizou-se a microseringa Hamilton®, adaptada a agulha de injeção dentival, no intuito de minimizar o dano ao animal. Antes da injeção, os animais eram anestesiados por imersão em triclaína 160 ug/mL.

### *2.3 Análise de Escores*

*Zebrafish* injetados eram postos individualmente em béqueres com capacidade de 600 mL, em 500 mL de água e observados ao longo de 60 minutos, com o objetivo de

analisar as atividades convulsivas apresentadas pelos mesmos. Foi utilizado o padrão de escores para convulsões induzidas por AC de Alfaro et al., de 2011, onde observa-se os seguintes comportamentos: Estágio (1), imobilidade e hiperventilação do animal; Estágio (2), nado em círculos; Estágio (3), movimentos rápidos da direita para a esquerda; Estágio (4), contrações musculares anormais e espasmódicas; Estágio (5), movimentos agitados do corpo inteiro como convulsões clônicas; Estágio (6), queda ao fundo do aquário e espasmos por um longo tempo; Estágio (7), morte.

#### *2.4 Análise Comportamental*

Os animais foram submetidos ao teste comportamental do *Open Tank* no quarto e no sétimo dias após a injeção. Tal procedimento trata-se de colocar os animais em um aquário trapezoidal, virtualmente dividido em três partes (topo, meio e fundo) para validar a atividade de exploração, assim como possíveis efeitos colaterais da convulsão, como imobilidade, alteração no padrão de velocidade e que podem vir a afetar distância percorrida (Rosemberg et al., 2011). Cada animal foi posto individualmente no tanque e observado ao longo de seis minutos, a água era trocada para cada peixe. Utilizou-se, em um computador, o software ANY-maze (Stoelting CO, USA) para gravar a atividade natatória dos animais em uma taxa de 30 quadros/segundo. Os dados de vídeo foram usados para determinar medidas relevantes, como a exploração vertical ao longo do tempo, o tempo gasto em cada área e as transições entre elas. Ainda outros pontos foram medidos ao longo do teste, distância percorrida, velocidade média e tempo de imobilidade.

#### *2.5 Análise Estatística*

A curva de escores convulsivos foi representada por mediana  $\pm$  intervalo interquartil por ser um dado não paramétrico. A área sob a curva e latência para escore 5 foram representadas por média  $\pm$  erro padrão e analisados por teste-t (comparação apenas entre



machos e fêmeas convulsionados), conforme Mussulini et al., 2013. Total de animais que apresentaram *status epilepticus* assim como a mortalidade foram representados por porcentagem e comparados por Qui-quadrado. O comportamento foi representado por média  $\pm$  erro padrão e analisado por ANOVA de duas vias seguida por teste de Bonferroni. Único parâmetro representado por mediana  $\pm$  intervalo neste caso foi o número de episódios de imobilidade. Considerou-se em todos os casos  $p < 0.05$  estatisticamente significativa.

### **3.Resultados:**

Analisando-se os escores convulsivos dos machos, percebe-se que estes seguem uma curva de crescimento até atingir certa estabilidade (Fig. 1.A). As maiores alterações são observadas nos minutos iniciais, com a elevação de escores até em torno dos 20 minutos; em 30 minutos, atingem escore 5 e a partir de então, seguem em uma leve variação entre 3 a 6 até o final da observação.

As fêmeas tendem a ser mais constantes no que se refere à permanência dos escores 5 e 6. Ocorre um rápido crescimento de escores nos tempos iniciais. Em torno de 10 minutos, grande parte já atingiu escore 5, sendo que em 20 minutos, todas já convulsionaram. A partir desse tempo são observadas alterações entre os escores 5 e 6. Após 30 minutos, ocorre o predomínio do escore 6, atingindo um platô e com algumas manifestações de escore 5 (Fig.1.B).

A análise do gráfico da área sob a curva no intervalo de tempo de 50 a 60 minutos mostra diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre machos e fêmeas (Fig. 2). Os machos apresentam uma área de  $48,50 \pm 3,167$  u.a., enquanto as fêmeas  $57,50 \pm 0,944$  u.a., o que permite sugerir maior resistência dos machos atingir e permanecer nos escores convulsivos elevados (escore 5 e 6) no fim do período de observação.

A latência para o escore 5, não apresentou diferença estatística entre os gêneros. O tempo médio para os machos foi de  $24 \pm 3,055$  min, enquanto o tempo para as fêmeas foi de  $16,25 \pm 2,631$  min para convulsionarem (Fig. 3).

Dentro das variações de uma crise convulsiva tem-se o *Status epilepticus* (SE), situação na qual a convulsão pode se estender por 30 minutos ou mais (Sierra et al., 2012). Neste trabalho, 100% das fêmeas apresentaram SE, enquanto que os machos, apenas 60% (Fig. 4) ( $p < 0.05$ ). Quanto à mortalidade ao fim de sete dias de observações, obteve-se 25% para as fêmeas e 40% para os machos (Fig. 5) ( $p < 0.05$ ).

No quarto dia após a injeção, os animais foram avaliados através da tarefa comportamental de *open tank*, no qual se observou que machos e fêmeas apresentavam-se de forma semelhante. Com 66% de animais sem presença de escores convulsivos, e 33% apresentando escore 6, ou seja, ainda em crise convulsiva. Tal fato mostra a intensidade de uma crise convulsiva induzida por AC, na qual os animais podem permanecer por dias em estado convulsivo. Entre outros parâmetros analisados visando ver um retorno a um comportamento similar ao controle, não foi possível observar diferença significativa entre distância percorrida, velocidade média, tão pouco na velocidade máxima apesar de apresentar séria tendência a alterações (Fig. 6 A-C). Os únicos parâmetros analisados que apontaram diferença estatística entre os grupos tratados e controles foram tempo total de imobilidade e episódios de imobilidade, mas sem diferença entre gênero (Fig. 6 D-E) ( $p < 0.05$ ).

#### **4. Discussão:**

Em sua utilização como modelo animal, o *zebrafish* tem sido usado largamente para estudar crises epiléticas, desde trabalhos envolvendo varreduras de fármacos (Berghmans et al., 2007) até aqueles que envolvem a busca por maior compreensão dos mecanismos relacionados às crises convulsivas (Baraban et al., 2007; Hortopan et al.,

2011). Dentre as muitas drogas pró-convulsivas já testadas, temos como um modelo emergente a utilização de AC na indução de convulsão do tipo tônico-clônica em *zebrafish*. Contudo, os estudos realizados têm focado na utilização de machos adultos, sem levar em consideração as possíveis diferenças que podem ocorrer entre gêneros, fato este que já foi apontado por diversos estudos realizados com roedores e humanos (Morales, 2011). Mediante tais fatos, nosso trabalho se propôs a ser o primeiro a mostrar as possíveis diferenças entre machos e fêmeas de *zebrafish* adulto, do ponto de vista do desenvolvimento de uma crise convulsiva e do período pós-ictal em termos comportamentais.

Perante os resultados deste estudo, observou-se que os padrões de crise convulsiva diferem entre gêneros, já que as fêmeas atingem rapidamente os escores convulsivos, mantendo um platô em torno de 5 e 6, enquanto os machos apresentam valores mais moderados e regressões a escores não convulsivos ao decorrer do tempo (Figura 1). Fato este comprovado quando se analisa o gráfico de área sob a curva (Figura 2), onde os machos apresentam uma menor área em relação às fêmeas, o que mostra sua maior resistência frente aos escores convulsivos, principalmente nos últimos 10 min de análise. Observa-se uma tendência de maior sensibilidade das fêmeas no quesito de latência, contudo não há diferença significativa, o que pode ser devido à utilização de intervalos de tempo muito longos durante a observação, não permitindo a visualização de variações mais sutis dentro dos dez minutos de cada intervalo.

Outro resultado que segue este padrão de diferenças é o *status epilepticus*, onde todas as fêmeas atingem-no, enquanto apenas 60% dos machos apresentam esta situação onde a crise convulsiva estende-se por mais de 30 minutos. Quanto aos dados de mortalidade durante os sete dias seguintes à injeção, as fêmeas mostraram-se mais

resistentes, com valores menores se comparado aos machos. Tal fato poderia ser justificado por estudos anteriores que mostram a capacidade neuroprotetora e de diminuição de danos frente a insultos de excitotoxicidade, através dos hormônios femininos estrógeno e progesterona (Velísková, 2006). Importante ressaltar que tais estudos foram realizados em roedores e humanos e em futuras análises poder-se-á averiguar se esta premissa é verdadeira no que cabe ao *zebrafish*.

A utilização da dose de 5 mg/kg de ácido cálnico mostrou-se eficiente frente aos objetivos deste estudo, já que se pretendia observar a geração de crises convulsivas, sem uma mortalidade exacerbada. Utilizando-se como base o estudo de Alfaro et al., de 2011, buscamos uma dose que se adequa-se às condições experimentais de nosso laboratório, assim como da linhagem teste utilizada. Neste estudo usou-se a linhagem shot-fin, sendo no estudo referência o long-fin. Importante ressaltar tais diferenças, já que estudos atuais demonstram que dependendo da linhagem adotada em um estudo específico pode se obter resultados diferentes para moléculas alvo-testadas. Encontrou-se diferença na mortalidade ao comparar-se machos e fêmeas, 40% e 25% respectivamente. Contudo em termos de mortalidade total obteve-se 33% de mortalidade a qual é aceitável para testes envolvendo convulsão e que não diferem do artigo de Alfaro et. al., 2011.

Para a avaliação do período pós-ictal optamos pela utilização da tarefa comportamental de *open tank*, observando o estado dos animais no quarto e sétimo dia após a injeção. Avaliou-se o comportamento dos animais submetidos ao protocolo de convulsão, observando se retornariam a níveis similares ao controle através dos dados como imobilidade, velocidade média e distância percorrida. Pode-se ver que uma parte dos animais (33%) continuava apresentando sinais de crise convulsiva, mesmo quatro

dias após a injeção de AC, o que corrobora com o fato de que as crises induzidas por este fármaco tendem a se estender por vários dias. Contudo, a maioria dos animais (66%) já apresentava comportamento semelhante ao controle, com nado normal e exploração do aquário.

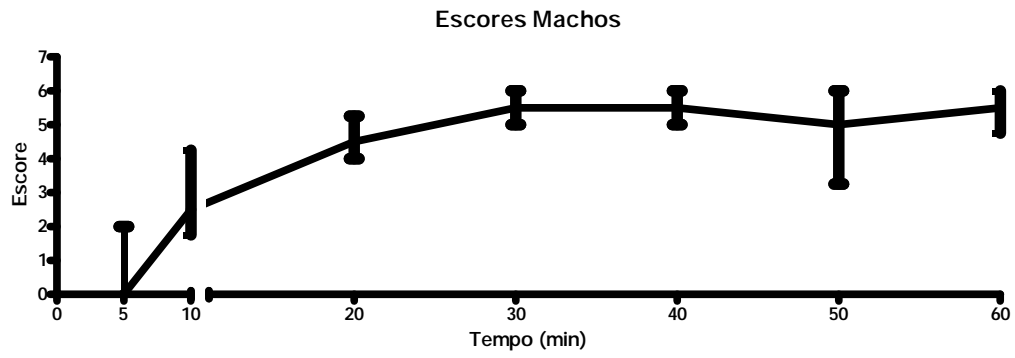
Antes de debater os resultados comportamentais aqui encontrados é importante ressaltar que o  $n$  experimental para tal análise encontrou-se em 6 decorrente da mortalidade de cada um dos grupos tratados. Este  $n$  restrito pode justificar as tendências observadas nas Figuras 6 A-C, e, além disso, explicar os grandes desvios vistos em todos os parâmetros (mesmos nos que apresentam diferença). Caso leve-se em consideração que 33% dos animais no quarto dia de ambos os grupos ainda apresentavam escore 6 de convulsão, há provavelmente subgrupos dentro desta análise comportamental. Contudo, subdividir tais grupos poderia comprometer eticamente a análise e entendeu-se que é fundamental ampliar o  $n$  experimental antes de qualquer conclusão contundente do ponto de vista de recuperação comportamental.

### **5. Conclusão:**

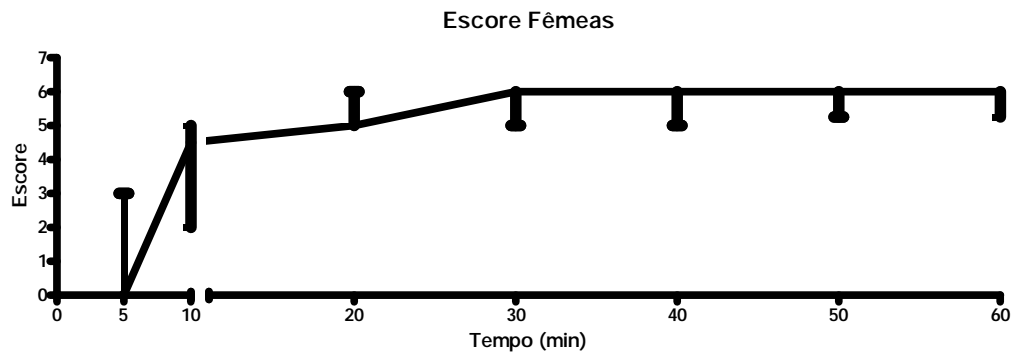
Sendo assim, existem diferenças entre machos e fêmeas neste protocolo de crise convulsiva induzida por ácido cáínico, principalmente nas respostas comportamentais observadas após a injeção do fármaco pró-convulsivante. Contudo, ainda são necessários estudos de caracterização hormonal em *zebrafish* para confirmar com precisão a influência dos hormônios sobre estes resultados.

## 6.Figuras:

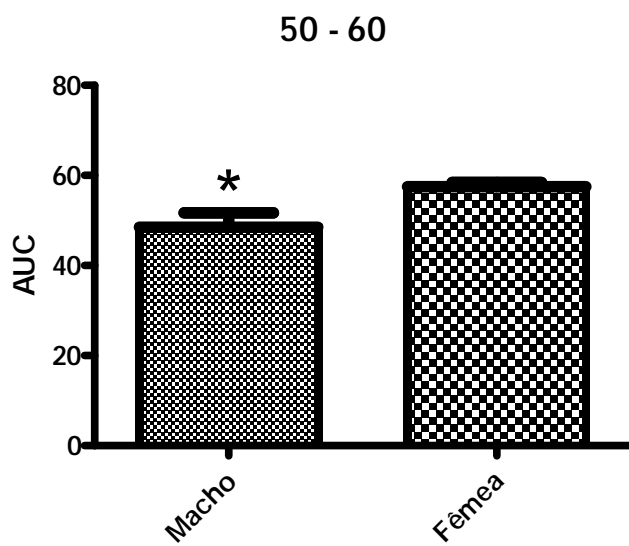
### Figura 1 A



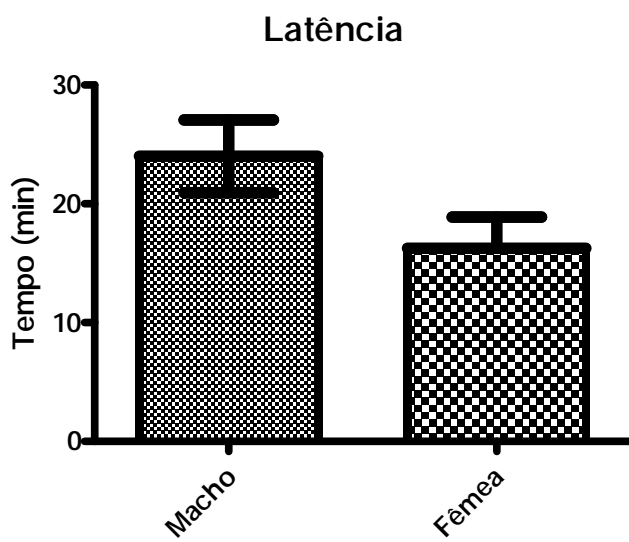
### Figura 1B



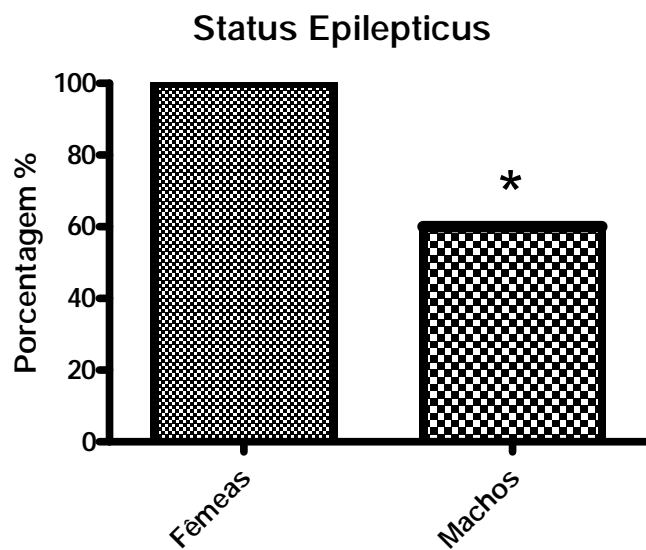
**Figura 2**



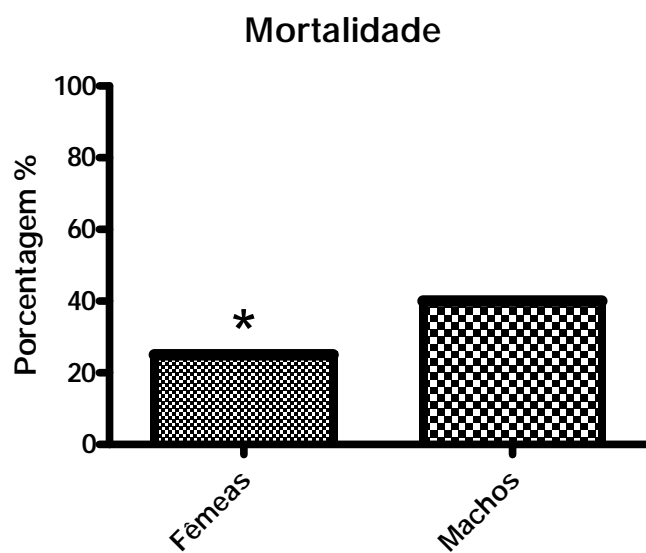
**Figura 3**



**Figura 4**

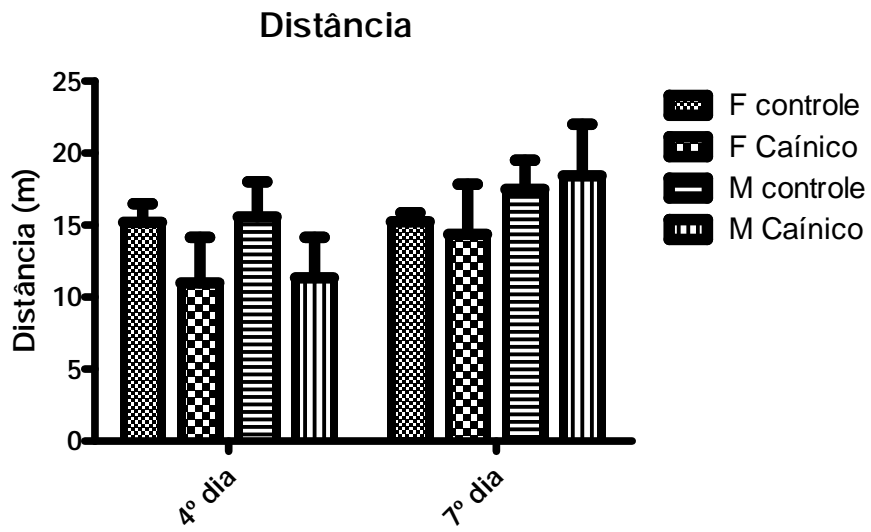


**Figura 5**

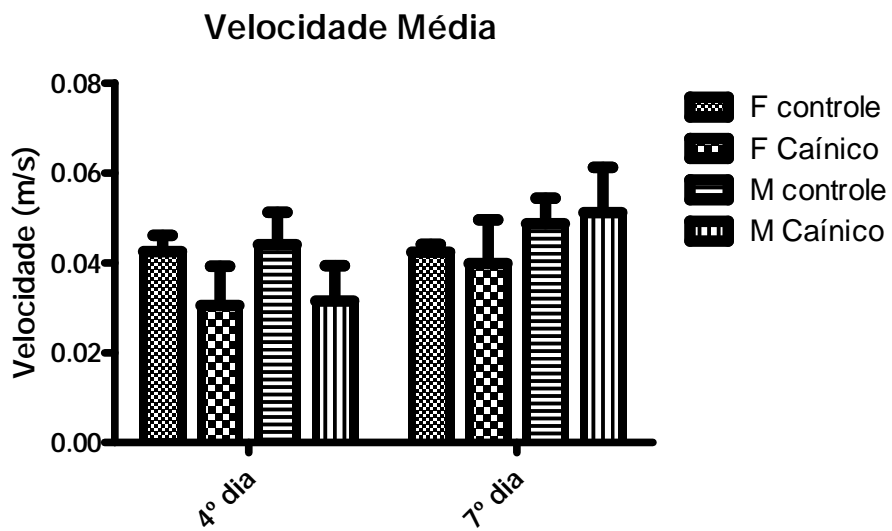




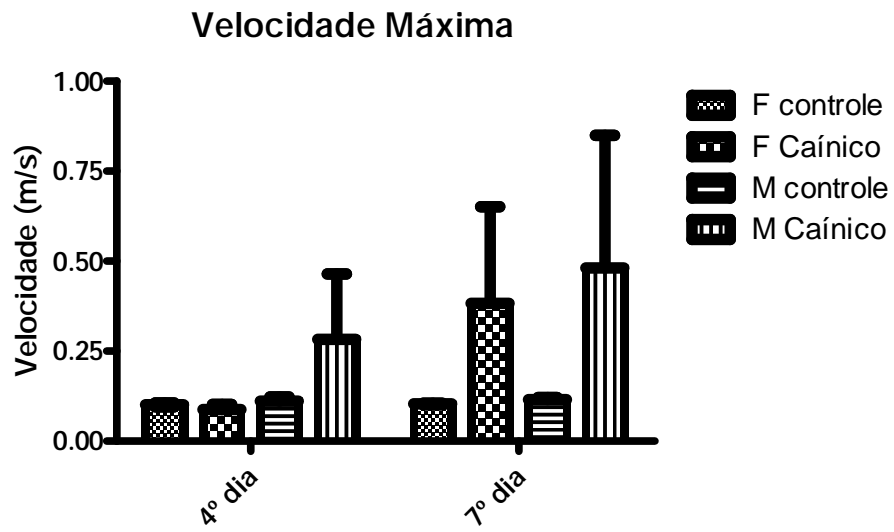
**Figura 6 A**



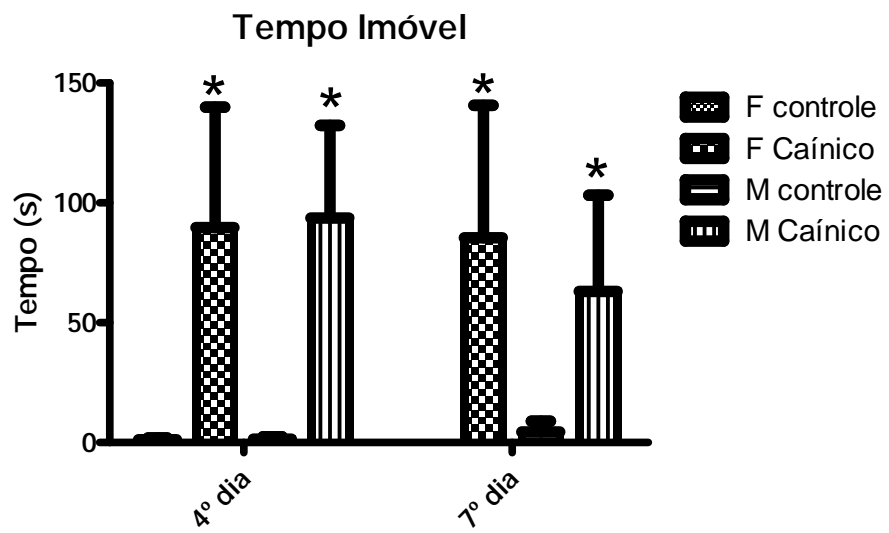
**Figura 6 B**



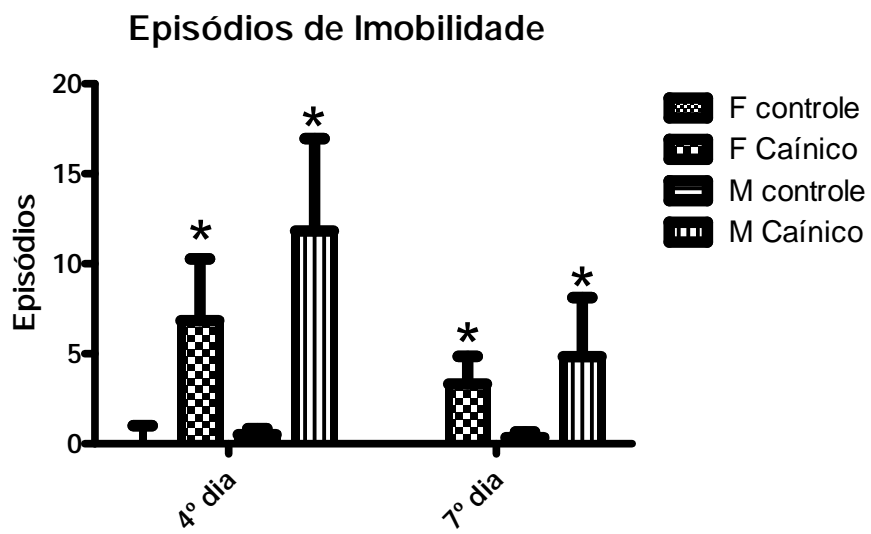
**Figura 6 C**



**Figura 6 D**



**Figura 6 E**



## 7. Legendas:

**Figura 1. Perfil convulsivo:** Perfil da progressão dos escores de convulsões ao longo do tempo. Primeiros 10 minutos de observação divididos em dois intervalos de 5 min. Tempo restante em intervalos de 10 min. (A) representa a progressão dos *zebrafish* machos e (B) fêmeas submetidos ao protocolo de convulsão.

**Figura 2. Intensidade da crise convulsiva:** A intensidade da crise convulsiva foi comparada pela média  $\pm$  erro do somatório da área sob a curva do perfil convulsivo de cada animal em cada um dos intervalos de tempo testados. O teste-t indica diferença significativa (\*), entre os gêneros no último intervalo de tempo analisado, apontando uma maior intensidade de crise no grupo de peixes fêmea.

**Figura 3. Latência para escore 5:** Não foi observada diferença estatística na latência para escore 5 entre machos e fêmeas.

**Figura 4. Porcentagem de animais que atingem *status epilepticus* (SE):** Teste qui-quadrado aponta diferença estatística (\*) entre os gêneros, com maior porcentagem de fêmeas em comparação com os machos.

**Figura 5. Mortalidade:** O teste de qui-quadrado aponta diferença estatística (\*) entre machos e fêmeas na porcentagem de mortalidade, com valor mais elevado para as fêmeas.

**Figura 6. Parâmetros comportamentais:** Parâmetros de análise comportamental durante o período pós-ictal. Não foi observada diferença estatística entre as distâncias percorridas (A), velocidade média (B) e velocidade máxima (C) nos diferentes dias de observação. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni indica diferença significativa entre os animais tratados e seus respectivos controles (\*) no tempo total de

imobilidade (D) e episódios de imobilidade (E), tanto 4 dias, quanto 7 dias após a injeção de AC. Contudo não foi possível observar diferença entre os gêneros, tão pouco diferença entre o mesmo grupo ao comparar-se o quarto e o sétimo dia. Tal fato não indica um recuperação dos animais mesmo 7 dias após a injeção.

## **8.Referências:**

Alfaro, JM., Ripoll-Gómez, J., Burgos, JS., 2011. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. *Eur J Neurosci.* 33, 1252–1255.

Baraban, SC., Dinday. MT., Castro, PA., Chege, S., Guyenet, S., 2007. A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia.* 48, 1151–1157.

Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., Goldsmith, P., 2007. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75, 18–28.

Fisher, RS., Engel, JJJr., 2010. Definition of the postictal state: When does it start and end?. *Epilepsy Behav.* 19, 100-104.

Fisher, RS., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., 2005. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 46, 470–472.

Hortopan, GA., Baraban, SC., 2011. Aberrant expression of genes necessary for neuronal development and Notch signaling in an epileptic mindbomb zebrafish. *Dev Dyn.* 240, 1964-1976.

Loscher, W., 2011. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 20, 359–368.

Loscher, W., Schmidt, D., 2011. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. *Epilepsia.* 52, 657–678.

Morales, T., 2011. Recent findings on neuroprotection against excitotoxicity in the hippocampus of female rats. *J Neuroendocrinol.* 23, 994-1001.

Mussulini, BH., Leite, CE., Zenki, KC., Moro, L., Baggio, S., Rico, EP., Rosemberg, DB., Dias, RD., Souza, TM., Calcagnotto, ME., Campos, MM., Battastini, AM., de Oliveira, DL., 2013. Seizures induced by pentylenetetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. *PLoS One.* 8, e54515.

Rosemberg, DB., Rico, EP., Mussulini, BH., Piato, AL., Calcagnotto, ME., Bonan, CD., Dias, RD., Blaser, RE., Souza, DO., de Oliveira, DL., 2011. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS One.* 6, e19397.

Sierra, S., Alfaro, JM., Sánchez, S., Burgos, JS., 2012. Administration of docosahexaenoic acid before birth and until aging decreases kainate-induced seizures in adult zebrafish. *Brain Res Bull.* 88, 467-470.

Velisková, J., 2006. The role of estrogens in seizures and epilepsy: the bad guys or the good guys?. *Neuroscience.* 138, 837-844.