

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Thainá Garbino dos Santos

**EFEITO DO AMBIENTE ENRIQUECIDO NO PERFIL
COMPORTAMENTAL DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) ADULTO**

Porto Alegre

2015

Thainá Garbino dos Santos

**EFEITO DO AMBIENTE ENRIQUECIDO NO PERFIL
COMPORTAMENTAL DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) ADULTO**

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

Área de habilitação: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Garbino dos Santos, Thainá
EFEITO DO AMBIENTE ENRIQUECIDO NO PERFIL
COMPORTAMENTAL DO PEIXE-ZEBRA (Danio rerio) ADULTO /
Thainá Garbino dos Santos. -- 2015.
53 f.

Orientador: Diogo Losch de Oliveira.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Enriquecimento ambiental. 2. Peixe-zebra. 3.
Comportamento. I. Losch de Oliveira, Diogo, orient.
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Thainá Garbino dos Santos

**EFEITO DO AMBIENTE ENRIQUECIDO NO PERFIL
COMPORTAMENTAL DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) ADULTO**

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

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Angelo Luis Stapassoli Piato – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Denis Broock Rosemberg – Universidade Federal de Santa Maria

Diogo Losch de Oliveira – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (orientador)

*Dedico este trabalho a minha mãe, Tatiana,
e minha avó, Marília, por tudo.*

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Tatiana, e a minha avó, Marília, o meu agradecimento incondicional por todo amor, exemplo e compreensão incansáveis durante todos esses anos.

A minha irmã, Alice, por me lembrar daquele pouquinho de criança que existe em nós e deixar tudo mais alegre e simples.

A toda a minha família, por cada auxílio, preocupação, conselho, caronas para a faculdade, animação e confiança para que chegasse até este momento. E claro, por cada tentativa de compreender minhas explicações sobre meus experimentos no laboratório.

Ao Afonso, por toda paciência, carinho, ajuda e incentivo para que nunca perdesse o pensamento positivo.

Ao meu orientador, Diogo, pelo período de orientação e, principalmente, por todo apoio e constante encorajamento para seguir cada passo da pesquisa com ânimo e muita determinação.

Aos meus colegas da Turma 9, que já fizeram com que todos os momentos destes quatro anos de puro companheirismo sejam lembrados com muito carinho e alegria.

Aos meus colegas do Laboratório 24: Luana (por compartilhar este período de “TCC” comigo), Mery, Sandro, Ben Hur, Cássio, Suelen, Emerson, Chairini, Diego, Kamila, Natã, Gabriela e Lucimara, e ao professor Renato, por cada aprendizado, sugestão e risada.

As demais pessoas que de alguma forma ou outra, auxiliaram positivamente para que este trabalho fosse possível.

RESUMO

O enriquecimento ambiental oferece estímulos sociais, sensoriais e cognitivos ao animal proporcionando um melhor bem-estar e comportamentos mais próximos ao seu natural, bem como aumento da proliferação e plasticidade neuronal, e melhoras cognitivas apresentadas em roedores - até mesmo em modelos experimentais de doenças neurológicas, distúrbios psiquiátricos e comportamento tipo ansiedade - em testes comportamentais. Um desses modelos é o de peixe-zebra (*Danio rerio*), com o qual estudos já demonstram que o ambiente enriquecido aumenta a sua neurogênese e que mostram que há possíveis mudanças comportamentais de acordo com o protocolo de enriquecimento ambiental utilizado. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar se há diferença no perfil comportamental dos peixes submetidos ao ambiente enriquecido durante uma semana. No teste de *open tank*, o grupo ambiente enriquecido (AE) demonstrou uma tendência para que a provável redução dos parâmetros distância e tempo no fundo seja refletida na tendência apresentada para um aumento na distância percorrida e tempo permanecido nas zonas meio e topo do aparato. No teste de claro/escuro, o AE passou menos tempo no compartimento escuro. Estes dados indicam que o AE possui um perfil ansiolítico, visto que, respectivamente, esses animais investem um pouco mais nas zonas meio e topo, e no compartimento claro. Já no teste de interação social, não houve diferença no perfil de interação geral entre os grupos, entretanto teve aumento no tempo médio por visita nas subzonas 3 e 4 que são as mais próximas ao aquário coespecífico, mostrando maneiras distintas de aproveitamento por ambos grupos - AE investindo num tempo de interação maior a cada entrada. Assim, nossos resultados demonstram que o enriquecimento ambiental altera o perfil comportamental do peixe-zebra apresentando uma característica mais ansiolítica e um modo de interação social diferenciado que necessita de uma análise mais atenciosa para que haja uma melhor compreensão e interpretação da maneira interativa.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1. ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL.....	8
1.2. PEIXE-ZEBRA	9
2 JUSTIFICATIVA	11
3 OBJETIVOS	12
3.1. OBJETIVO GERAL.....	12
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	13
5 CONCLUSÕES.....	32
6 PERSPECTIVAS.....	33
REFERÊNCIAS	34
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “<i>BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH</i>”.....	38

1 INTRODUÇÃO

1.1. ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

Em modelos animais, já é descrito que alterações ambientais levam a diversas mudanças desde a expressão gênica a padrões comportamentais (Pryce, Mohammed et al. 2002). Normalmente, os animais de laboratório são mantidos em um ambiente padrão de biotério, no qual não há nenhum estímulo adicionado na caixa moradia. O enriquecimento ambiental é uma técnica que visa o fornecimento de estímulos: social, sensorial e cognitivo ao animal proporcionando comportamentos mais próximos ao seu natural e uma melhora do seu bem-estar (Bezzina, Verret et al. 2015).

Em roedores, os protocolos de enriquecimento ambiental já estão bem descritos e se baseiam na colocação dos animais em grupos em caixas moradia maiores utilizando de diversos utensílios, tais como: rodas de correr, labirintos em tubo de plástico e objetos de diferentes cores e tamanhos, na caixa moradia do animal, sendo que suas localizações e configurações são alteradas em determinados períodos para que os estímulos do ambiente continuem constante (van Praag, Kempermann et al. 2000; Sztainberg and Chen 2010; Garthe, Roeder et al. 2015). Entretanto, estes protocolos variam bastante no período em que os animais são mantidos no ambiente enriquecido de acordo com o distinto enfoque do estudo - podendo ser de 6 semanas ou 78 semanas.

Já no modelo experimental de peixe-zebra, os protocolos de ambiente enriquecido mais utilizados usufruem de um contexto inanimado com pedras ao fundo do aquário e/ou plantas artificiais e em grupo que serve como o estímulo social (von Krogh, Sorensen et al. 2010; Collymore, Tolwani et al. 2015; Manuel, Gorissen et al. 2015). Entretanto, a permanência dos animais no aquário com enriquecimento ambiental também possui uma grande diversidade - podendo ser de 1 semana ou 24 semanas.

Diversos estudos demonstram que a exposição de roedores ao enriquecimento ambiental altera a expressão comportamental desses animais em distintos testes comportamentais (Birch, McGarry et al. 2013; Grinan-Ferre, Perez-Caceres et al. 2015; Zerwas, Trouche et al. 2015). Assim, trabalhos mostram que o ambiente enriquecido apresenta uma melhora na cognição em diferentes modelos animais de doenças neurológicas, tais como epilepsia (Fares, Belmeguenai et al. 2013; Kotloski and Sutula 2015), doença de Alzheimer (Costa, Cracchiolo et al. 2007; Polito, Chierchia et al. 2014), autismo (Favre, La

Mendola et al. 2015) e doença de Huntington (Mo, Renoir et al. 2015), bem como em distúrbios psiquiátricos (Laviola, Hannan et al. 2008), como esquizofrenia (Burrows, McOmish et al. 2015), e no comportamento tipo ansiedade (Grippio, Ihm et al. 2014; Brenes, Lackinger et al. 2015; Manuel, Gorissen et al. 2015; Ragu Varman and Rajan 2015; Soares, Rorato et al. 2015).

O enriquecimento ambiental está associado com alterações de aumento de volume do cérebro de camundongos adultos com, aproximadamente, apenas 24 horas após a exposição ao ambiente (Scholz, Allemang-Grand et al. 2015). Além disso, estudos com roedores mostram que há uma relação entre o ambiente enriquecido e um aumento na neurogênese (Clemenson, Deng et al. 2015; Clemenson, Lee et al. 2015), bem como um ambiente socialmente enriquecido induz a plasticidade neuronal em cérebro de peixe-zebra (*Danio rerio*) (Lindsey and Tropepe 2014), e um com plantas artificiais e substratos gera um aumento na proliferação de neurônios (von Krogh, Sorensen et al. 2010).

1.2. PEIXE-ZEBRA

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo (3-4 cm) de água doce da família *Cyprinidae*, originário do sul da Ásia (Spence, Gerlach et al. 2008). Atualmente, sua utilização experimental é ampla, atingindo diferentes áreas de estudo desde biologia do desenvolvimento e pesquisa por novos fármacos a teratologia (Vascotto, Beckham et al. 1997). Isto se deve principalmente a características biológicas e alguns fatores favoráveis desta espécie, tais como: embriões translúcidos, rápido desenvolvimento e ciclo biológico, grande prole, baixo custo por animal e susceptibilidade à manipulação genética (Lele and Krone 1996).

O peixe-zebra também está sendo bastante utilizado para o estudo de neurociências comportamentais. Desta maneira, testes comportamentais foram desenvolvidos com fins semelhantes aos já amplamente utilizados em modelos de roedores: *open tank* (Rosemberg, Rico et al. 2011), teste claro/escuro (Maximino, Marques de Brito et al. 2010) e interação social (também conhecido como: preferência social); bem como *shoaling* e *mirror biting* (Pham, Raymond et al. 2012). Estes testes, então, são baseados em comportamentos intrínsecos deste modelo animal - como preferência por locais fundos e escuros, e nado em cardume -, e permitem que sejam avaliados diversos fatores – comportamento tipo ansiedade e perfil exploratório e locomotor, por exemplo.

Assim como em outras espécies de peixes da família *Cyprinidae*, o peixe-zebra apresenta uma extensiva neurogênese na vida adulta (Zupanc, Hinsch et al. 2005) e já foram descritas 16 regiões encefálicas proliferativas (Grandel, Kaslin et al. 2006), empregando o peixe-zebra também como um bom modelo para o estudo da neurogênese tanto em fase larval quanto na fase adulta. Neste modelo animal, já foram identificados diversos sistemas de neurotransmissores – observados também em mamíferos - como: histaminérgico (Kaslin and Panula 2001), colinérgico (Behra, Cousin et al. 2002), purinérgico (Kucenas, Li et al. 2003), serotoninérgico (Rink and Guo 2004), dopaminérgico (Boehmler, Obrecht-Pflumio et al. 2004), gabaérgico (Kim, Nam et al. 2004) e glutamatérgico (Edwards and Michel 2002).

2 JUSTIFICATIVA

O enriquecimento ambiental vem sendo bastante estudado sobre suas influências e seus efeitos em diferentes modelos de doenças e distúrbios neurológicos, visto que apresenta um aumento na neurogênese e plasticidade neuronal, e uma melhora cognitiva analisadas por testes comportamentais. Um dos modelos animais que está sendo utilizado para a avaliação destas alterações é o peixe-zebra, entretanto, ainda não há trabalhos que mostrem se há uma mudança no perfil comportamental quando esses animais são submetidos ao protocolo de ambiente enriquecido por uma semana.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do ambiente enriquecido no perfil comportamental do peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental em peixe-zebra adulto sobre:

- a) Parâmetros locomotores e de exploração vertical;
- b) Preferência social;
- c) Comportamento tipo ansiedade.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE O PERFIL COMPORTAMENTAL DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) ADULTO**” foi formatado conforme as normas para publicação junto à revista *Behavioural Brain Research*.

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE O
PERFIL COMPORTAMENTAL DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) ADULTO**

Thainá Garbino dos Santos, Sandro Daniel Córdova, Ben Hur Marins Mussulini, Diogo Losch
de Oliveira*

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.*

(*) Endereço para correspondência:

Diogo Losch de Oliveira

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Prédio Anexo

Bairro Santa Cecília

Porto Alegre – RS, Brasil

CEP: 90035-003

Fone: 51 3308 5556

E-mail: diogolosch@gmail.com

RESUMO

O enriquecimento ambiental oferece estímulos sociais, sensoriais e cognitivos ao animal proporcionando comportamentos mais próximos ao seu natural, bem como aumento da proliferação neuronal e melhoras cognitivas apresentadas em diferentes modelos animais. Um desses modelos é o de peixe-zebra (*Danio rerio*), que demonstrou possíveis mudanças comportamentais de acordo com o protocolo de enriquecimento ambiental utilizado. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar se há diferença no perfil comportamental dos peixes submetidos ao ambiente enriquecido durante uma semana. No teste de *open tank*, o AE demonstrou uma tendência para que a provável redução dos parâmetros distância e tempo no fundo seja refletida na tendência apresentada para um aumento na distância percorrida e tempo permanecido nas zonas meio e topo do aparato. No teste de claro/escuro, o AE passou menos tempo no compartimento escuro. Estes dados indicam que o AE possui um perfil ansiolítico, visto que esses animais investem um pouco mais nas zonas meio e topo, e no compartimento claro. Já no teste de interação social, não houve diferença no perfil de interação geral entre os grupos, entretanto teve aumento no tempo médio por visita nas subzonas 3 e 4 que são as mais próximas ao aquário coespecífico, mostrando maneiras distintas de aproveitamento por ambos grupos - AE investindo num tempo de interação maior a cada entrada. Assim, nossos resultados demonstram que o enriquecimento ambiental altera o perfil comportamental do peixe-zebra apresentando uma característica mais ansiolítica e um modo de interação social diferenciado.

Palavras-chave: enriquecimento ambiental; peixe-zebra; *open tank*; teste de claro/escuro; interação social.

1. INTRODUÇÃO

Alterações ambientais levam a diversas mudanças biológicas, desde a expressão gênica até padrões comportamentais [1]. O enriquecimento ambiental oferece estímulos sociais, sensoriais e cognitivos ao animal, proporcionando comportamentos mais próximos ao seu natural e uma melhora do seu bem-estar [2]. A plasticidade neuronal [3, 4] e neurogênese [5] também são influenciadas por este tipo de ambiente, sendo fatores reconhecidos e indicados como responsáveis pelas melhoras cognitivas apresentadas em diferentes modelos animais de doenças neurológicas mantidos no ambiente enriquecido, tais como epilepsia [6], doença de Alzheimer [7, 8], autismo [9] e doença de Huntington [10], bem como em distúrbios psiquiátricos [11] e no comportamento tipo ansiedade [4, 12-15].

Atualmente, a utilização do peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo animal para estudos científicos é ampla, atingindo diferentes áreas de estudo desde a biologia do desenvolvimento a teratologia [16], bem como modelo para estudos em neurociências comportamental [17]. O ambiente enriquecido já sendo utilizado e investigado sobre seus possíveis efeitos neste modelo animal [3, 5, 15, 18]. Os protocolos mais utilizados de enriquecimento ambiental usufruem de um aquário, no qual os animais são colocados em grupo (estímulo social), com um contexto inanimado com pedras ao fundo do aquário e/ou plantas artificiais. Entretanto, a permanência dos animais nestes protocolos possui uma grande diversidade - podendo ser de 1 semana ou 24 semanas.

Como já foi visto que, em modelo de peixe-zebra, há um aumento de proliferação neuronal e possíveis mudanças comportamentais de acordo com o protocolo de enriquecimento ambiental utilizado, o objetivo do nosso estudo foi investigar se há diferença no perfil comportamental dos peixes submetidos ao ambiente enriquecido durante uma semana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (número do protocolo: #26568).

2.2. ANIMAIS E MANUTENÇÃO

Foram utilizados 78 peixes-zebra *wild-type* adultos (com aproximadamente 8 meses de idade) de ambos os sexos. Os animais foram adquiridos de um fornecedor comercial (Delphis, RS, Brasil) e ambientados às condições do nosso biotério durante duas semanas em aquários de 40 L com sistema de recirculação de água e densidade de 3 animais/litro, com a temperatura ($28^{\circ}\text{C} \pm 1$) e o pH ($7,5 \pm 0,5$) controlados, e ciclo claro/escuro de 14:10h. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia com *Artemia sp.* (Artêmia Salina do RN, Brasil) e outras duas vezes com ração flocada para peixes (alconBASIC[®], Alcon, Brasil).

2.3. AMBIENTE ENRIQUECIDO

Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o ambiente de permanência durante uma semana até os testes comportamentais: ambiente padrão (AP) e ambiente enriquecido (AE). Foram mantidos em aquários de 8L, sendo o AP constituído somente por um aquário com filtração e recirculação de água, e o AE composto por pedras ao fundo do aquário e três plantas artificiais verdes (25 cm). A quantidade de peixes por aquário foi de 13, entretanto somente 10 animais de cada grupo foram utilizados nos testes comportamentais – visto que os animais restantes foram para evitar que os últimos animais ficassem isolados no aquário antes do teste. Uma hora antes do início dos testes, os animais foram alimentados com ração flocada e depois de trinta minutos, os animais foram retirados do seu ambiente de permanência e colocados em outros aquários somente com água para ambientação na sala de teste. Cada animal foi utilizado para um único teste comportamental.

2.4. TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes comportamentais foram realizados entre às 9h e às 12h, e analisados pelo *software* ANY-maze[®] (Stoelting CO, EUA).

2.4.1. Teste de Open Tank

O teste de *open tank* foi realizado de acordo com Rosemberg *et al* [19]. Foi utilizado um aparato trapezoidal com dimensões de 28 cm x 23 cm x 16 cm x 7 cm (comprimento do topo x comprimento do fundo x altura x largura) preenchido com 1,5 L de água. Os peixes foram observados e filmados durante 360 s. A filmagem de cada teste foi realizada da visão lateral do aquário que ficou a uma distância de 46 cm da câmera (Logitech[®] HD Pro Webcam C920, Logitech, Suíça) e a 7 cm de um fundo amarelo - utilizado para que este ficasse uniforme durante a gravação.

2.4.2. Teste de Claro/Escuro

O teste de claro/escuro foi adaptado de Maximino *et al.* [20]. Foi utilizado um aparato dividido em dois compartimentos de tamanhos iguais (um branco e outro preto) e possui dimensões de 30 cm x 10 cm x 15 cm (comprimento x largura x altura) com uma coluna de água de 4 cm. A luminosidade dentro do aquário foi de 210-215 lux em ambos os compartimentos. Os peixes foram observados e filmados durante 360 s. A filmagem foi realizada com a câmera (Logitech[®] HD Pro Webcam C920, Logitech, Suíça) da visão superior do aquário, sendo o fundo do aquário branco para a melhor identificação do animal dentro do aparato.

2.4.3. Teste de Interação Social

O teste de interação social foi adaptado de Pham *et al.* [21]. O aparato foi constituído de três aquários: um aquário central de teste - dimensões 28,9 cm x 10 cm x 15cm (comprimento x largura x altura) – e outros dois de dimensões 10 cm x 10 cm x 15cm (comprimento x largura x altura), um em cada lado do aquário teste - o aquário de

coespecíficos (3 peixes) e o aquário oposto somente com água. A coluna de água foi mantida em 6 cm e a duração de cada teste foi de 360 s. A filmagem foi realizada da visão lateral do aquário que ficou a uma distância de 29,5 cm da câmera (Logitech[®] HD Pro Webcam C920, Logitech, Suíça) e a 6 cm de um fundo amarelo - utilizado para que este ficasse uniforme durante a gravação.

2.4.4. Análise estatística

Todos os dados foram analisados pelo teste t de *Student* para amostras não pareadas e expressos como Média \pm Erro Padrão da Média, sendo considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. TESTE DE *OPEN TANK*

No teste de *open tank*, os animais de ambos os grupos, AP e AE, percorreram aproximadamente 16 m (**Fig. 1A**) e passaram praticamente todo o período apresentando atividade natatória (**Fig. 1B**). Entretanto, a figura ilustrativa do perfil exploratório dos grupos (**Fig. 1C**) demonstra que o AE tem uma tendência a permanecer mais tempo nas zonas meio e fundo do aparato. Assim, quando analisamos o comportamento de exploração dos animais pela divisão do aparato em 3 grandes zonas (fundo, meio e topo), observa-se que os animais do grupo AE tem uma tendência a passar menos tempo e percorrer uma distância menor na zona do fundo do aparato quando comparado aos animais do grupo AP (**Fig. 2A, E**). Além disso, os animais do grupo AE apresentam uma tendência de percorrer uma maior distância na zona do meio e do topo quando comparados aos animais do grupo AP (**Fig. 2B, C**). Ainda, o grupo AE apresentou uma tendência para permanecer mais tempo (**Fig. 2F, G**) e entrar mais vezes nestas duas zonas (**Fig. 2 J, K**).

3.2. TESTE CLARO/ESCURO

No teste claro/escuro, os animais do grupo AE permanecem menos tempo no compartimento escuro do que os animais do grupo AP (teste t de *Student*, $p < 0,05$; **Fig. 3A**). Assim, o grupo AP permanece 56% do tempo total no compartimento, enquanto o AE, 42% (**Fig. 3B**). Em relação ao número de entradas em cada compartimento do aparato, não houve diferença (**Fig. 3C, D**).

3.3. TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL

No teste de interação social, a distância percorrida total e tempo móvel não apresentaram diferença significativa entre os grupos (**Fig. 4A, B**). Na zona coespecífico, o grupo AE apresenta uma tendência a permanecer mais tempo nesta zona quando comparado ao grupo AP (**Fig. 5A**). Além disso, o grupo AE entra menos vezes na zona coespecífico quando comparado ao grupo AP (teste t de *Student*, $P < 0,05$; **Fig. 5D**). Assim, os animais do grupo AE apresentaram um tempo médio de cada visita na zona maior (teste t de *Student*, $P < 0,01$; **Fig. 5G**). Já na zona centro, o AE permanece um tempo menor (teste t de *Student*, $P < 0,05$), bem como uma tendência para um número reduzido de entradas, não havendo diferença no tempo médio de cada visita na zona (**Fig. 5B, E, H**). Entretanto, a zona oposto não possui nenhuma diferença nos parâmetros analisados (**Fig. 5C, F, I**). No *occupancy plot* (**Fig. 5J**), observa-se que não há diferença no perfil geral de interação, mostrando um desenho em L deitado. Entretanto, aparentemente, ambos os grupos parecem atuar de maneiras distintas na zona coespecífico.

A fim de se obter uma forma de quantificar o comportamento observado no *occupancy plot* dos grupos na zona coespecífico, foi realizada duas divisões da zona: (1) regiões topo e fundo; e (2) subzonas 1 a 6 (**Fig. 7**). Os resultados mostram que o AE entra uma quantidade de vezes menor tanto no topo (teste t de *Student*, $P < 0,05$; **Fig. 6A**) quanto no fundo (teste t de *Student*, $P < 0,01$; **Fig. 6B**). No topo, não houve diferença entre os grupos no tempo permanecido (**Fig. 6C**), entretanto, no fundo, observa-se uma tendência do AE passar um tempo maior que o AP (**Fig. 6D**). Assim, o AE apresenta um tempo médio maior de cada visita tanto no topo (teste t de *Student*, $p < 0,05$; **Fig. 6E**) quanto no fundo (teste t de *Student*, $p < 0,001$; **Fig. 6F**).

Os resultados das 6 subzonas da zona coespecífico mostram que o AE apresenta uma diminuição no número de entradas em todas (**Fig. 7A-F**), sendo que na subzona 3, 5 e 6 possui diferença estatística (teste t de *Student*, $p < 0,05$). Ainda, observamos que há também

uma tendência de um aumento no tempo gasto pelo AE somente nas subzonas 3 e 4 (**Fig. 7I, J**), assim, apresentando o tempo médio de cada visita na subzona maior nestas duas subzonas (teste t de *Student*, $p < 0,5$; **Fig. 7O, P**).

4. DISCUSSÃO

O aumento da utilização do peixe-zebra para fins experimentais influenciou para que diversos autores descrevessem testes comportamentais e os próprios comportamentos intrínsecos deste modelo animal. [19-22] Como o ambiente enriquecido apresenta diversos efeitos descritos em roedores, como aumento na plasticidade neuronal [4] e melhora cognitiva [8], ele também está sendo utilizado no modelo de peixe-zebra a fim de investigar os possíveis benefícios trazidos [3, 15, 18]. Neste trabalho, mostramos que o ambiente enriquecido também influencia o perfil comportamental do peixe-zebra no teste de *open tank*, claro/escuro e interação social.

Sabe-se que o peixe-zebra possui uma preferência natural por locais fundos e escuros (escototaxia). Entretanto, observamos que o grupo AE apresentou exploração um pouco mais dispersa e homogênea no aparato no teste de *open tank* (**Fig. 1C, 2H**), com tendência a redução da distância percorrida (**Fig. 2A**) e tempo gasto (**Fig. 2E**) no fundo. Ademais, o AE também demonstra uma tendência para que essa provável redução dos parâmetros distância e tempo no fundo, seja refletida na tendência apresentada para um aumento na distância percorrida e tempo permanecido nas zonas meio (**Fig. 2B, F**) e topo (**Fig. 2 C, G**) do aparato. Estes dados podem indicar que os animais que permaneceram uma semana no ambiente enriquecido possuem um perfil ansiolítico, visto que mostram evidências de que ao invés de permanecer na zona mais profunda do aparato como AP, que seria mais “seguro”, os animais AE investem também um pouco mais nas outras zonas.

Outros dados que corroboram com isto são o do teste claro/escuro, no qual obtivemos que AE, apesar de não apresentar diferença no número de entradas em cada compartimento do aparato, passou menos tempo no compartimento escuro ($p < 0,05$; **Fig. 3A**) – não apresentando a escototaxia natural do peixe-zebra. Este perfil ansiolítico que os animais do AE apresentaram nos testes de *open tank* e claro/escuro demonstram que pela primeira vez os resultados de ambos os testes comportamentais corroboram entre si e podem ser relacionados para explicar um perfil comportamental diferenciado em um grupo experimental de peixe-zebra submetido ao ambiente enriquecido durante uma semana.

No teste de interação social, observamos que a tendência que o AE apresenta de passar maior tempo (**Fig. 5A**) e o número de entradas reduzido ($p < 0,05$; **Fig. 5D**) na zona coespecífico refletem para que tempo médio de cada visita nesta zona seja maior ($p < 0,01$; **Fig. 5G**). Como o perfil geral de interação do aparato é similar em ambos os grupos (**Fig. 5J**), isto indica que o que pode diferir entre AP e AE é o modo como cada um interage e explora a zona coespecífico. Com as posteriores subdivisões desta zona, obtivemos que este aumento no tempo médio por visita nas subzonas 3 e 4 se mantém (subzona 3: $P < 0,05$; **Fig. 7O** / subzona 4: $P < 0,05$; **Fig. 7P**). Isto representa que as duas subzonas que são mais próximas ao aquário coespecífico são aproveitadas de maneiras distintas por ambos grupos, mostrando que o AE investe num tempo de interação maior a cada entrada. Sendo assim, demonstra-se a necessidade desta avaliação para que seja possível uma melhor compressão e interpretação não somente do perfil interacional, mas também da maneira como esta interação ocorre.

Assim, nossos resultados mostram que o ambiente enriquecido altera o perfil comportamental do peixe-zebra, demonstrando que ele apresenta um perfil mais ansiolítico e que possui um modo de interação social diferenciado.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Pryce C, Mohammed A, Feldon J. Environmental manipulations in rodents and primates. Insights into pharmacology, biochemistry and behaviour. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;73:1-5.
- [2] Bezzina C, Verret L, Halley H, Dahan L, Rampon C. Environmental enrichment does not influence hypersynchronous network activity in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2015;7:178.
- [3] Lindsey BW, Tropepe V. Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels. *Dev Neurobiol.* 2014;74:1053-77.
- [4] Brenes JC, Lackinger M, Hoglinger GU, Schrott G, Schwarting RK, Wöhr M. Differential effects of social and physical environmental enrichment on brain plasticity, cognition, and ultrasonic communication in rats. *J Comp Neurol.* 2015.
- [5] von Krogh K, Sorensen C, Nilsson GE, Overli O. Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. *Physiol Behav.* 2010;101:32-9.
- [6] Fares RP, Belmeguenai A, Sanchez PE, Kouchi HY, Bodennec J, Morales A, et al. Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats. *PLoS One.* 2013;8:e53888.
- [7] Polito L, Chierchia A, Tunesi M, Bouybayoune I, Kehoe PG, Albani D, et al. Environmental enrichment lessens cognitive decline in APP23 mice without affecting brain sirtuin expression. *J Alzheimers Dis.* 2014;42:851-64.
- [8] Costa DA, Cracchiolo JR, Bachstetter AD, Hughes TF, Bales KR, Paul SM, et al. Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. *Neurobiol Aging.* 2007;28:831-44.
- [9] Favre MR, La Mendola D, Meystre J, Christodoulou D, Cochrane MJ, Markram H, et al. Predictable enriched environment prevents development of hyper-emotionality in the VPA rat model of autism. *Front Neurosci.* 2015;9:127.
- [10] Mo C, Renoir T, Hannan AJ. What's wrong with my mouse cage? Methodological considerations for modeling lifestyle factors and gene-environment interactions in mice. *J Neurosci Methods.* 2015.
- [11] Laviola G, Hannan AJ, Macri S, Solinas M, Jaber M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol Dis.* 2008;31:159-68.
- [12] Grippo AJ, Ihm E, Wardwell J, McNeal N, Scotti MA, Moenk DA, et al. The effects of environmental enrichment on depressive and anxiety-relevant behaviors in socially isolated prairie voles. *Psychosom Med.* 2014;76:277-84.
- [13] Soares RO, Rorato RC, Padovan D, Lachat JJ, Antunes-Rodrigues J, Elias LL, et al. Environmental enrichment reverses reduction in glucocorticoid receptor expression in the hippocampus of and improves behavioral responses of anxiety in early malnourished rats. *Brain Res.* 2015;1600:32-41.
- [14] Ragu Varman D, Rajan KE. Environmental Enrichment Reduces Anxiety by Differentially Activating Serotonergic and Neuropeptide Y (NPY)-Ergic System in Indian Field Mouse (*Mus booduga*): An Animal Model of Post-Traumatic Stress Disorder. *PLoS One.* 2015;10:e0127945.
- [15] Manuel R, Gorissen M, Stokkermans M, Zethof J, Ebbesson LO, van de Vis H, et al. The effects of environmental enrichment and age-related differences on inhibitory avoidance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton). *Zebrafish.* 2015;12:152-65.

- [16] Vascotto SG, Beckham Y, Kelly GM. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol.* 1997;75:479-85.
- [17] Sumbre G, de Polavieja GG. The world according to zebrafish: how neural circuits generate behavior. *Front Neural Circuits.* 2014;8:91.
- [18] Collymore C, Tolwani RJ, Rasmussen S. The Behavioral Effects of Single Housing and Environmental Enrichment on Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54:280-5.
- [19] Rosemberg DB, Rico EP, Mussulini BH, Piato AL, Calcagnotto ME, Bonan CD, et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS One.* 2011;6:e19397.
- [20] Maximino C, Marques de Brito T, Dias CA, Gouveia A, Jr., Morato S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat Protoc.* 2010;5:209-16.
- [21] Pham M, Raymond J, Hester J, Kyzar E, Gaikwad S, Bruce I, et al. Assessing Social Behavior Phenotypes in Adult Zebrafish: Shoaling, Social Preference, and Mirror Biting Tests. In: Kalueff AV, Stewart AM, editors. *Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research*: Humana Press; 2012. p. 231-46.
- [22] Blaser RE, Chadwick L, McGinnis GC. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2010;208:56-62.

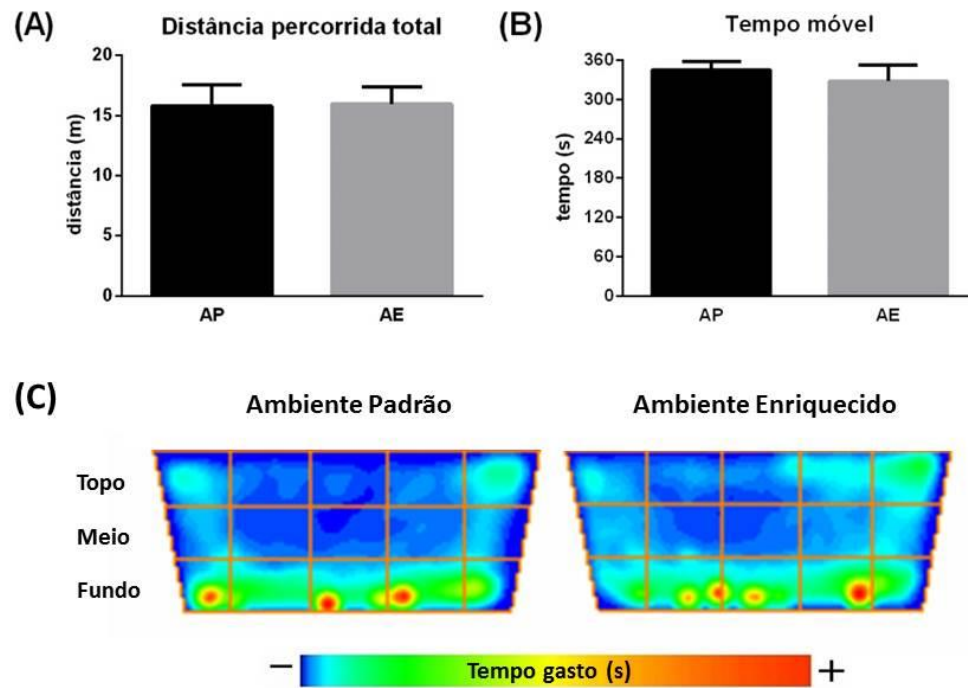


Figura 1. Análise do perfil locomotor e exploratório dos grupos Ambiente Padrão (AP) e Ambiente Enriquecido (AE) no teste de *open tank*. Distância percorrida total (A), tempo móvel total (B) e *occupancy plot* (C). Foi utilizado teste t de *Student*. N amostral = 7/grupo.

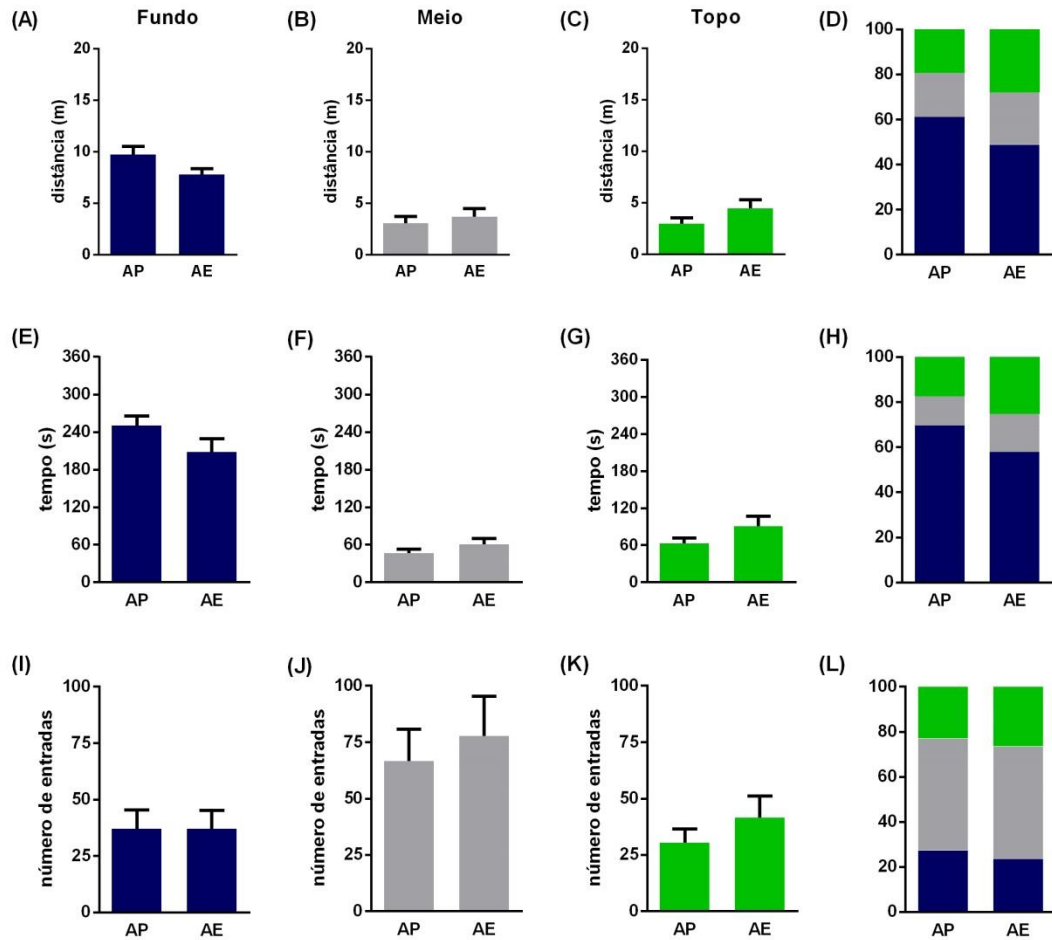


Figura 2. Análise do perfil locomotor e exploratório nas diferentes zonas do aparato (fundo, meio e topo) dos grupos Ambiente Padrão (AP) e Ambiente Enriquecido (AE) no teste de *open tank*. Distância percorrida no fundo (A), no meio (B) e no topo (C). Tempo permanecido no fundo (E), no meio (F) e no topo (G). Número de entradas no fundo (I), no meio (J) e no topo (K). Foi utilizado teste t de *Student*. Porcentagem da distância (D), do tempo (H) e do número de entradas (L) em cada zona em relação ao seu respectivo total. N amostral = 7/grupo.

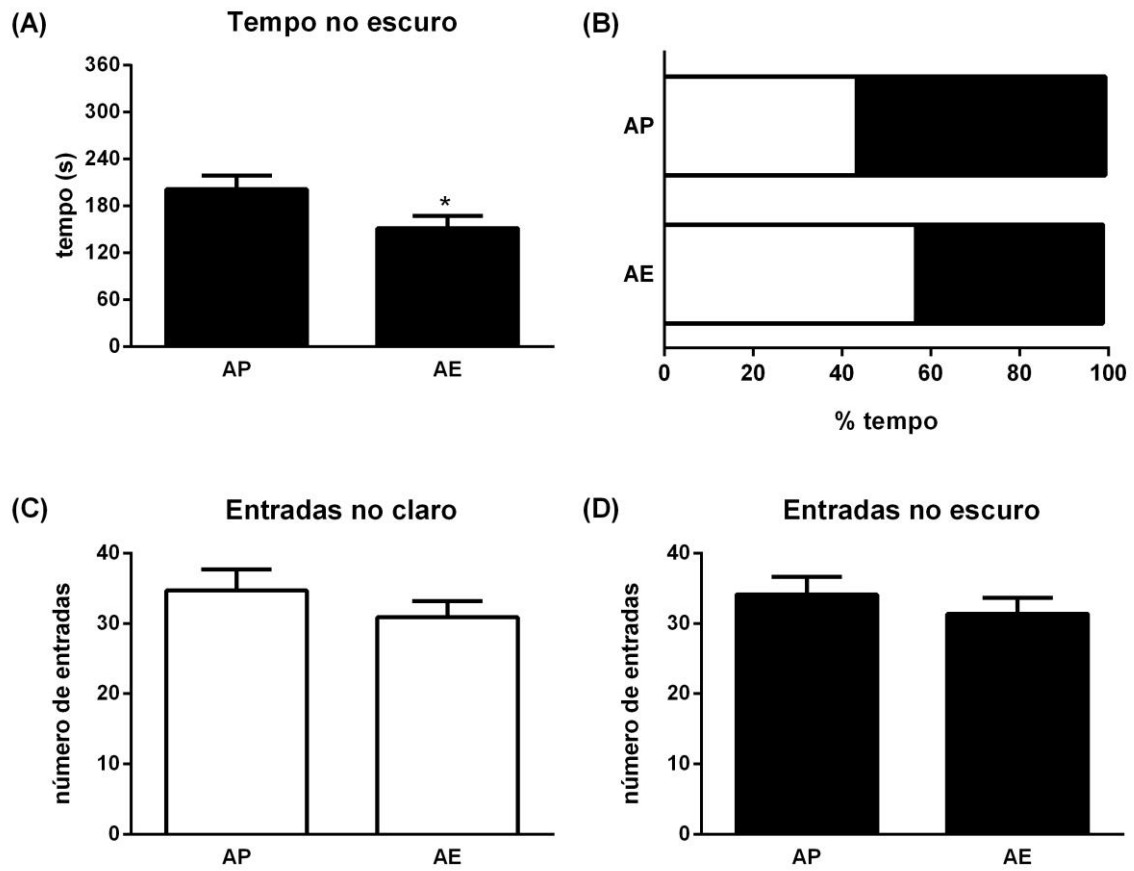


Figura 3. Análise da preferência dos grupos Ambiente Padrão (AP) e Ambiente Enriquecido (AE) entre os compartimentos do teste claro/escuro. Tempo gasto no compartimento escuro do aparato (A), porcentagem do tempo gasto em cada compartimento (B), número de entradas no compartimento claro (C) e número de entradas no escuro (D). Teste t de *Student*. *=P<0,05. N amostral = 9-10/grupo.

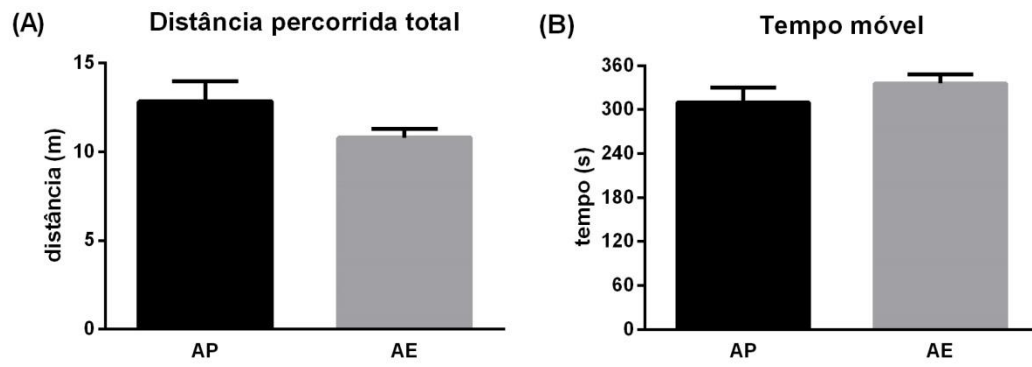


Figura 4. Análise da locomoção dos grupos Ambiente Padrão (AP) e Ambiente Enriquecido (AE) no teste de interação social. Distância percorrida total (A) e tempo móvel total (B). Foi utilizado teste t de *Student*. N amostral = 9-10/grupo.

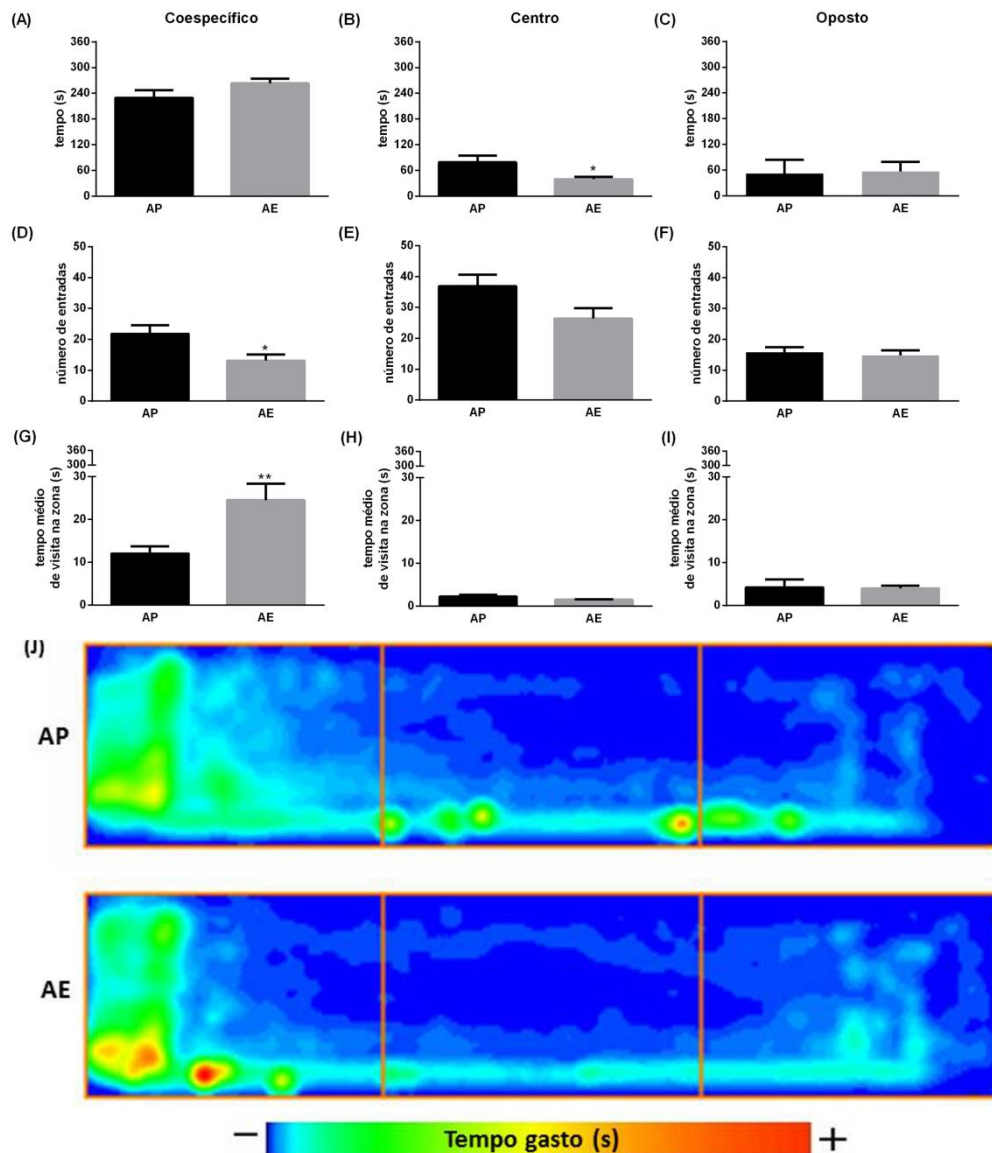


Figura 5. Análise do perfil de interação dos grupos Ambiente Padrão (AP) e Ambiente Enriquecido (AE) no teste de interação social. Tempo permanecido na zona coespecífico (A), na zona centro (B) e na zona oposto (C). Número de entradas na zona coespecífico (D), na zona centro (E) e na zona oposto (F). Tempo médio de cada visita na zona coespecífico (G), na zona centro (H) e na zona oposto (I). *Occupancy plot* (J). Foi utilizado teste t de *Student*. *= $P < 0,05$. **= $P < 0,01$. N amostral = 9-10/grupo.

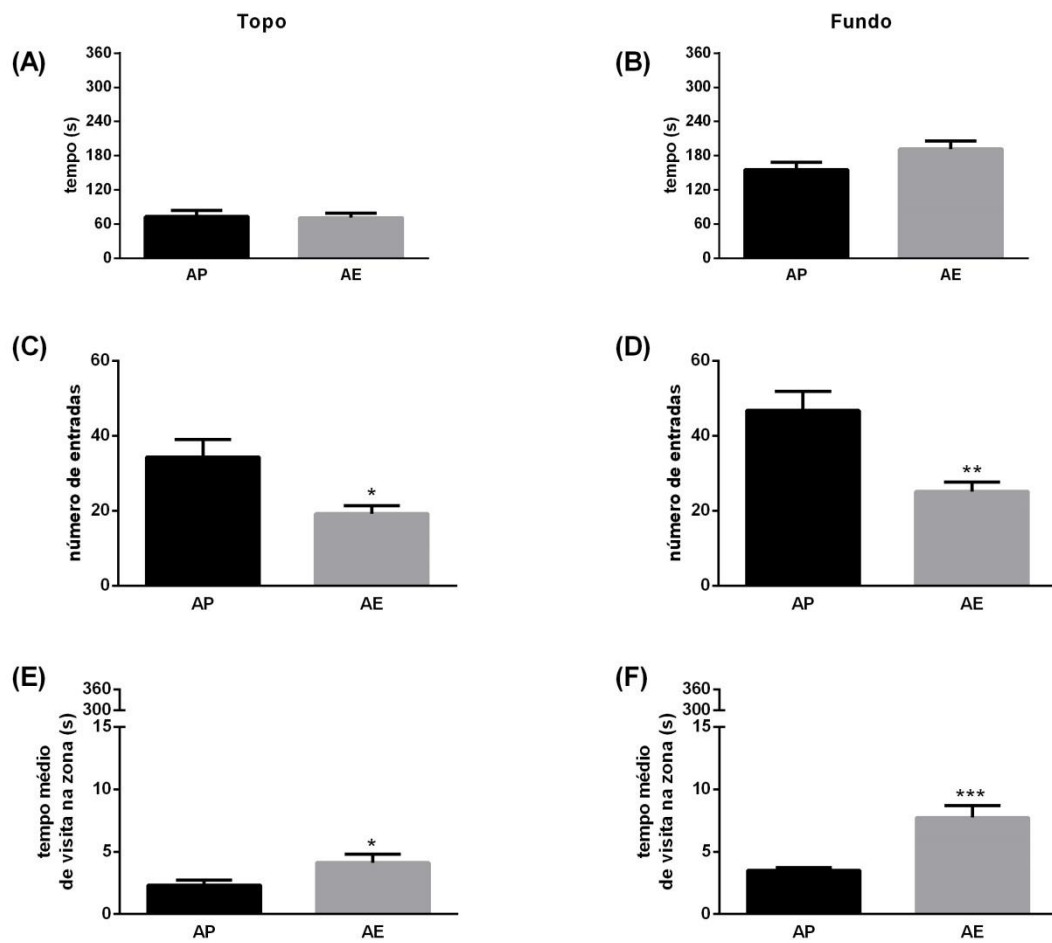


Figura 6. Análise do perfil de interação dos grupos Ambiente Padrão (AP) e Ambiente Enriquecido (AE) nas regiões topo e fundo da zona coespecífico do teste de interação social. Tempo permanecido no topo (A) e no fundo (B). Número de entradas no topo (C) e no fundo (D). Tempo médio de cada visita no topo (E) e no fundo (F). Foi utilizado teste t de *Student*. *= $P < 0,05$. **= $P < 0,01$. ***= $P < 0,001$. N amostral = 9-10/grupo.

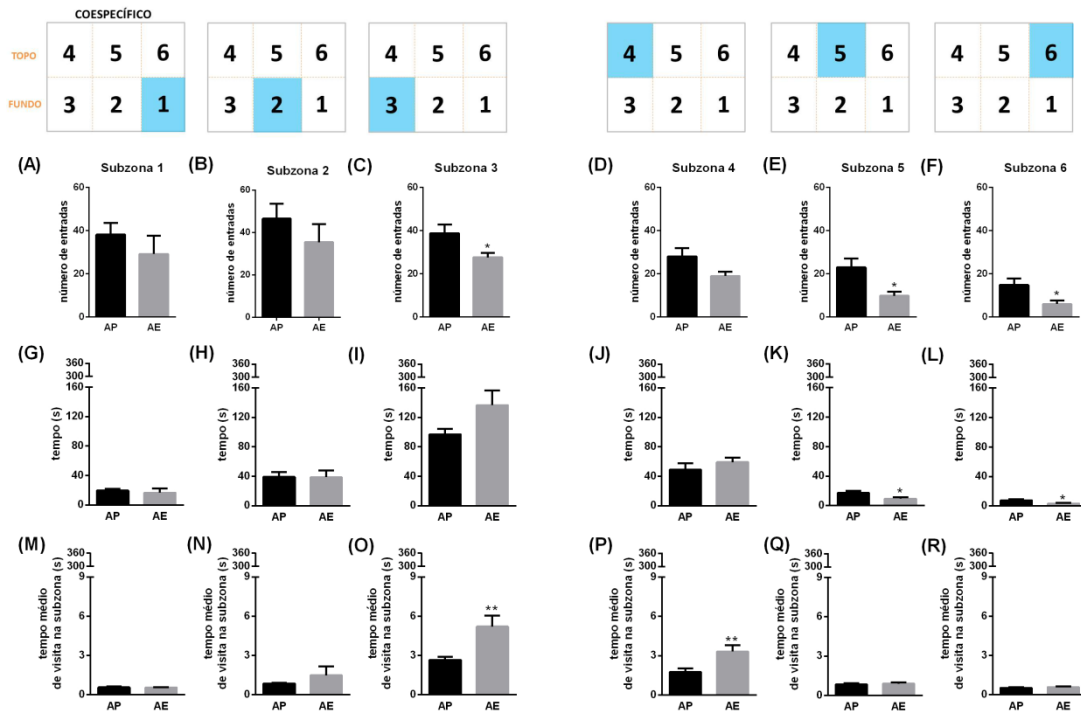


Figura 7. Análise do perfil de interação dos grupos Ambiente Padrão (AP) e Ambiente Enriquecido (AE) nas subzonas numeradas de 1 a 6 da zona coespecífico do teste de interação social. Tempo permanecido nas subzonas 1-6 (A-F, respectivamente), número de entradas nas subzonas 1-6 (G-L, respectivamente) e tempo médio de cada visita nas subzonas 1-6 (M-R, respectivamente). Foi utilizado teste t de *Student*. *= $P < 0,05$. **= $P < 0,01$. N amostral = 9-10/grupo.

5 CONCLUSÕES

Como já demonstrado em roedores, o enriquecimento ambiental proporciona melhorias cognitivas e no comportamento tipo-ansiedade em testes comportamentais. Neste trabalho, em modelo de peixe-zebra, um perfil mais ansiolítico foi apresentado a partir dos dados dos testes de *open tank* e claro/escuro, mostrando uma tendência dos animais permanecerem mais nas zonas meio e topo, e menos no compartimento escuro, respectivamente. Já no teste de interação social, foi demonstrado que o peixe-zebra submetido ao protocolo de ambiente enriquecido não possui um perfil de interação diferenciado do grupo padrão, mas possui um modo distinto de interagir na zona coespecífico – investindo em um tempo maior a cada visita nas duas subzonas mais próximas para interação. Assim, este estudo demonstrou que o peixe-zebra quando mantido em um enriquecimento ambiental por uma semana também sofre alterações comportamentais nos três testes realizados.

6 PERSPECTIVAS

Por serem dados preliminares, uma das perspectivas é o aumento do número amostral de ambos os grupos em todos os testes comportamentais. Posteriormente, também serão realizadas as análises imunohistoquímicas para avaliação da neurogênese e suas características.

REFERÊNCIAS

- Behra, M., X. Cousin, et al. (2002). "Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo." Nat Neurosci 5(2): 111-118.
- Bezzina, C., L. Verret, et al. (2015). "Environmental enrichment does not influence hypersynchronous network activity in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease." Front Aging Neurosci 7: 178.
- Birch, A. M., N. B. McGarry, et al. (2013). "Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner." Hippocampus 23(6): 437-450.
- Boehmler, W., S. Obrecht-Pflumio, et al. (2004). "Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish." Dev Dyn 230(3): 481-493.
- Brenes, J. C., M. Lackinger, et al. (2015). "Differential effects of social and physical environmental enrichment on brain plasticity, cognition, and ultrasonic communication in rats." J Comp Neurol.
- Burrows, E. L., C. E. McOmish, et al. (2015). "Environmental Enrichment Ameliorates Behavioral Impairments Modeling Schizophrenia in Mice Lacking Metabotropic Glutamate Receptor 5." Neuropsychopharmacology 40(8): 1947-1956.
- Clemenson, G. D., W. Deng, et al. (2015). "Environmental enrichment and neurogenesis: from mice to humans." Current Opinion in Behavioral Sciences 4: 56-62.
- Clemenson, G. D., S. W. Lee, et al. (2015). "Enrichment rescues contextual discrimination deficit associated with immediate shock." Hippocampus 25(3): 385-392.
- Collymore, C., R. J. Tolwani, et al. (2015). "The Behavioral Effects of Single Housing and Environmental Enrichment on Adult Zebrafish (*Danio rerio*)." J Am Assoc Lab Anim Sci 54(3): 280-285.
- Costa, D. A., J. R. Cracchiolo, et al. (2007). "Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms." Neurobiol Aging 28(6): 831-844.
- Edwards, J. G. and W. C. Michel (2002). "Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb." J Comp Neurol 454(3): 294-309.
- Fares, R. P., A. Belmeguenai, et al. (2013). "Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats." PLoS One 8(1): e53888.
- Favre, M. R., D. La Mendola, et al. (2015). "Predictable enriched environment prevents development of hyper-emotionality in the VPA rat model of autism." Front Neurosci 9: 127.

- Garthe, A., I. Roeder, et al. (2015). "Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis." Hippocampus.
- Grandel, H., J. Kaslin, et al. (2006). "Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate." Dev Biol 295(1): 263-277.
- Grinan-Ferre, C., D. Perez-Caceres, et al. (2015). "Environmental Enrichment Improves Behavior, Cognition, and Brain Functional Markers in Young Senescence-Accelerated Prone Mice (SAMP8)." Mol Neurobiol.
- Grippo, A. J., E. Ihm, et al. (2014). "The effects of environmental enrichment on depressive and anxiety-relevant behaviors in socially isolated prairie voles." Psychosom Med 76(4): 277-284.
- Kaslin, J. and P. Panula (2001). "Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*)." J Comp Neurol 440(4): 342-377.
- Kim, Y. J., R. H. Nam, et al. (2004). "Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*)." Neurosci Lett 355(1-2): 29-32.
- Kotloski, R. J. and T. P. Sutula (2015). "Environmental enrichment: evidence for an unexpected therapeutic influence." Exp Neurol 264: 121-126.
- Kucenas, S., Z. Li, et al. (2003). "Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family." Neuroscience 121(4): 935-945.
- Laviola, G., A. J. Hannan, et al. (2008). "Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders." Neurobiol Dis 31(2): 159-168.
- Lele, Z. and P. H. Krone (1996). "The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research." Biotechnol Adv 14(1): 57-72.
- Lindsey, B. W. and V. Tropepe (2014). "Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels." Dev Neurobiol 74(11): 1053-1077.
- Manuel, R., M. Gorissen, et al. (2015). "The effects of environmental enrichment and age-related differences on inhibitory avoidance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton)." Zebrafish 12(2): 152-165.
- Maximino, C., T. Marques de Brito, et al. (2010). "Scototaxis as anxiety-like behavior in fish." Nat Protoc 5(2): 209-216.
- Mo, C., T. Renoir, et al. (2015). "What's wrong with my mouse cage? Methodological considerations for modeling lifestyle factors and gene-environment interactions in mice." J Neurosci Methods.

- Pham, M., J. Raymond, et al. (2012). Assessing Social Behavior Phenotypes in Adult Zebrafish: Shoaling, Social Preference, and Mirror Biting Tests. Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research. A. V. Kalueff and A. M. Stewart, Humana Press. 66: 231-246.
- Polito, L., A. Chierchia, et al. (2014). "Environmental enrichment lessens cognitive decline in APP23 mice without affecting brain sirtuin expression." J Alzheimers Dis 42(3): 851-864.
- Pryce, C., A. Mohammed, et al. (2002). "Environmental manipulations in rodents and primates. Insights into pharmacology, biochemistry and behaviour." Pharmacol Biochem Behav 73(1): 1-5.
- Ragu Varman, D. and K. E. Rajan (2015). "Environmental Enrichment Reduces Anxiety by Differentially Activating Serotonergic and Neuropeptide Y (NPY)-Ergic System in Indian Field Mouse (*Mus booduga*): An Animal Model of Post-Traumatic Stress Disorder." PLoS One 10(5): e0127945.
- Rink, E. and S. Guo (2004). "The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain." Neuroscience 127(1): 147-154.
- Rosemberg, D. B., E. P. Rico, et al. (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(5): e19397.
- Scholz, J., R. Allemang-Grand, et al. (2015). "Environmental enrichment is associated with rapid volumetric brain changes in adult mice." Neuroimage 109: 190-198.
- Soares, R. O., R. C. Rorato, et al. (2015). "Environmental enrichment reverses reduction in glucocorticoid receptor expression in the hippocampus of and improves behavioral responses of anxiety in early malnourished rats." Brain Res 1600: 32-41.
- Spence, R., G. Gerlach, et al. (2008). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*." Biol Rev Camb Philos Soc 83(1): 13-34.
- Sztainberg, Y. and A. Chen (2010). "An environmental enrichment model for mice." Nat Protoc 5(9): 1535-1539.
- van Praag, H., G. Kempermann, et al. (2000). "Neural consequences of environmental enrichment." Nat Rev Neurosci 1(3): 191-198.
- Vascotto, S. G., Y. Beckham, et al. (1997). "The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology." Biochem Cell Biol 75(5): 479-485.
- von Krogh, K., C. Sorensen, et al. (2010). "Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments." Physiol Behav 101(1): 32-39.
- Zerwas, M., S. Trouche, et al. (2015). "Environmental enrichment rescues memory in mice deficient for the polysialyltransferase ST8SiaIV." Brain Struct Funct.

Zupanc, G. K., K. Hensch, et al. (2005). "Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain." J Comp Neurol 488(3): 290-319.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH”

GUIDES FOR AUTHORS

Before you begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see

<http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse*
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution*

Subscription

- *Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).*

- *No open access publication fee payable by authors.*

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

- *Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

- *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is USD 2400, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an

appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 18 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submission Address

<http://ees.elsevier.com/bbr/>

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is

used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Length Of Article

Original Research Articles should not exceed 12,000 words (inclusive of abstract, references, and figure legends).

Short communications should not exceed 3500 words (inclusive of abstract, references, and figure legends) and should not be divided into sections. No more than 25 references and four figures or tables should be included.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- *Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.*

- *Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.*

- *Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.*

- *Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did*

the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The Abstract should not exceed 250 words

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- *Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.*
- *Embed the used fonts if the application provides that option.*

- *Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.*

- *Number the illustrations according to their sequence in the text.*
- *Use a logical naming convention for your artwork files.*
- *Provide captions to illustrations separately.*
- *Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.*
- *Submit each illustration as a separate file.*

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- *Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;*
- *Supply files that are too low in resolution;*
- *Submit graphics that are disproportionately large for the content.*

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/behavioural-brain-research>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with

their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data

during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

3D neuroimaging

You can enrich your online articles by providing 3D neuroimaging data in NIfTI format. This will be visualized for readers using the interactive viewer embedded within your article, and will enable them to: browse through available neuroimaging datasets; zoom, rotate and pan the 3D brain reconstruction; cut through the volume; change opacity and color mapping; switch between 3D and 2D projected views; and download the data. The viewer supports both single (.nii) and dual (.hdr and .img) NIfTI file formats. Recommended size of a single uncompressed dataset is maximum 150 MB. Multiple datasets can be submitted. Each dataset will have to be zipped and uploaded to the online submission system via the '3D neuroimaging data' submission category. Please provide a short informative description for each dataset by filling in the 'Description' field when uploading a dataset. Note: all datasets will be available for downloading from the online article on ScienceDirect. If you have concerns about your data being downloadable, please provide a video instead. For more information see: <http://www.elsevier.com/3DNeuroimaging>.