

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL
SOBRE O COMPORTAMENTO E O PADRÃO DE CRISES
EPILEPTICAS INDUZIDAS POR PTZ EM PEIXE ZEBRA ADULTO**

Sandro Daniel Córdova

Orientador: Prof. Dr Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre, 2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL
SOBRE O COMPORTAMENTO E O PADRÃO DE CRISES
EPILÉPTICAS INDUZIDAS POR PTZ EM PEIXE ZEBRA ADULTO**

Sandro Daniel Córdova

Orientador: Prof. Dr Diogo Losch de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito
parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica

Porto Alegre, 2016

Dedico esta tese de doutorado a minha esposa Cristiane.
Agradeço imensamente por todo o incentivo e a compreensão ao longo desta
caminhada.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Diogo, pela amizade, pela confiança depositada em mim, pela dedicação em todas as etapas da presente tese e pelo empenho em coordenar o laboratório. Obrigado pela orientação imprescindível, que sempre objetivou aprimorar esta tese.

Aos amigos do laboratório, pelas amizades que aqui fiz e que levarei para a vida. Em especial as pessoas que colaboraram para o desenvolvimento desta tese: Thainá, Cassio, Ben Hur, Suelen e Eduardo. Foram anos de trabalho e amizade fundamentais para a conclusão desta tese. Quero agradecer também aos que passaram pelo laboratório e aqueles que ainda permanecem, mas que não participaram diretamente nesta tese, mas que deixaram ua marca neste trabalho e na minha vida: Mery, Marcos, Denis, Milena, Chairini, Emerson, Natã, Luana, Gabriela, Charles, Diego, Kamila, Mariana, Gislaine, Matheus, Lucimara, Renata, Adriana V., Adriana D., Vinicius e Lauryn.

Aos professores dos laboratórios 22, 24, 26 e 28: Ana, Tadeu, Fabio, Lisiane, Luis e Diogo Souza, com os quais mais convivi, que são exemplos de profissionais e que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos alunos dos laboratórios 22, 24, 26 e 28, onde encontrei grandes colegas e amigos de verdade.

Aos professores que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal através das disciplinas ministradas, das colaborações, das experiências trocadas e das conversas pelo departamento.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pela convivência e pela dedicação em tornar nosso trabalho possível.

A minha família, Cris, Juvenal, Elisabetha, Francisco e Silvio, pela compreensão em todos os momentos que não pude lhes dar a atenção merecida e acima de tudo por todo o apoio que sempre me deram para continuar acreditando e buscando novos objetivos.

Ao CNPq e a Capes pelo apoio financeiro concedido para a realização desta tese

“Cuidado com gente que não tem dúvida. Gente que não tem dúvida não é capaz de inovar, de reinventar, não é capaz de fazer de outro modo. Gente que não tem dúvida só é capaz de repetir”

Mario Sergio Cortella

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
I. INTRODUÇÃO	5
1. EPILEPSIAS: ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLOGIA	5
2. PREJUÍZOS CEREBRAIS INDUZIDOS POR CRISES EPILÉPTICAS	6
3. TRATAMENTO DAS EPILEPSIAS	7
4. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DAS EPILEPSIAS	8
4.1. COMPLICAÇÕES CAUSADAS PELA UTILIZAÇÃO DE FAES	9
5. TRATAMENTOS DOS DANOS NEURONAIS E COGNITIVOS CAUSADOS PELAS CRISES EPILÉPTICAS	12
6. ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	13
6.1. ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E CRISES EPILÉPTICAS	14
6.2. ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E PEIXE ZEBRA (<i>DANIO RERIO</i>)	15
7. TESTES COMPORTAMENTAIS EM PEIXE ZEBRA	16
7.1. OPEN TANK	17
7.2. PREFERÊNCIA SOCIAL	17
7.3. CLARO/ESCURO	18
II. OBJETIVOS	22
OBJETIVO GERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
CAPÍTULO I	22
CAPÍTULO II	22
PARTE II	24
III. RESULTADOS	25
CAPÍTULO I	25
CAPÍTULO II	53
PARTE III	80
IV. DISCUSSÃO	81
V. CONCLUSÕES	94
VI. PERSPECTIVAS	96
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

RESUMO

As epilepsias são um conjunto de distúrbios que incorrem sobre o sistema nervoso central que apresentam como característica crises recorrentes causadas por descargas neuronais anormais, hipersicrônicas e que ocorrem de maneira transitória. Em todo o mundo, aproximadamente 1% da população (65 milhões de pessoas) tem epilepsia, sendo que países menos desenvolvidos apresentam uma maior incidência. Algumas crises epiléticas, como as convulsões, apresentadas por pacientes com epilepsia podem gerar prejuízos cognitivos como uma maior incidência de depressão, déficit de atenção, comprometimento da aprendizagem, entre outros transtornos. As crises epiléticas são também motivo de estigmatização, que em muitos casos, leva ao isolamento social. Por se tratar de um conjunto de transtornos que comprometem o funcionamento cerebral, o tratamento das epilepsias é complexo e variado, com respostas distintas entre os pacientes. O tratamento com fármacos antiepiléticos apresenta bons resultados e se mostra eficiente para a maioria dos pacientes. No entanto, uma parcela dos pacientes não responde ao tratamento com fármacos antiepiléticos, necessitando de outras intervenções para cessar as crises e mesmo, reverter os danos causados por elas. Os tratamentos não farmacológicos mais comumente utilizados envolvem dietas, estimulação neural e remoção cirúrgica da área epileptogênica. O tratamento com exercício físico e com o enriquecimento ambiental em modelos animais de epilepsia em roedores têm se mostrado eficazes na prevenção do surgimento e também na redução do número de crises. Neste contexto, o objetivo da presente tese foi avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre o padrão de crise epilética e sobre o comportamento do peixe zebra submetido a crises epiléticas induzidas por PTZ, além de identificar fatores que influenciam a resposta do peixe zebra no teste de claro/escuro visando acessar o comportamento tipo ansiedade, tendo em vista que os testes presentes na literatura apresentam discrepâncias quanto a preferência neste modelo. A altura da coluna de água se mostrou determinante na escolha do peixe zebra quando exposto a um compartimento branco e outro preto, com os animais preferindo o compartimento preto apenas na menor coluna de água testada. Frente a um aquário com o fundo inclinado que gera um compartimento mais profundo do que o outro, mais uma vez a altura da coluna de água se mostrou relevante, mas neste caso os animais pareceram enfrentar um paradigma entre permanecer no compartimento mais profundo (quando este era preto ou no aquário transparente) ou permanecer no compartimento preto (quando o lado branco foi configurado para ser mais profundo). A intensidade luminosa utilizada também se mostrou um parâmetro determinante na resposta do peixe zebra no teste de claro/escuro. Com uma iluminação de 70 lux e uma profundidade de 4 cm os animais permaneceram mais tempo no compartimento preto. Utilizando 100 lux de iluminação os animais passam mais tempo explorando o compartimento branco. Quando utilizamos 200 lux de iluminação ou 100 lux no centro de um compartimento e 200 lux no outro lado do aquário, os animais não apresentam preferência por nenhum dos lados. A crise epilética induzida por PTZ em peixe zebra se mostrou menos intensa nos animais que foram mantidos a um aquário contendo enriquecimento ambiental do que aquela apresentada por animais mantidos em aquários padrão. O enriquecimento ambiental gera alteração do padrão exploratório do peixe zebra e previne as alterações observadas na locomoção dos animais submetidos ao modelo de crises induzidas por PTZ. As crises induzidas por PTZ tende a alterar a interação social do peixe zebra, enquanto o enriquecimento ambiental previne tal mudança comportamental. As crises induzidas por PTZ, assim como, a exposição por uma semana ao modelo de enriquecimento ambiental, não alteram o comportamento tipo ansioso do peixe zebra quando testado no teste de claro/escuro. Com base nos nossos achados, podemos concluir que o enriquecimento ambiental se configura em uma intervenção com potencial importante na prevenção e no tratamento de crises epiléticas, além de apresentar potencial para recuperar alterações cognitivas geradas pelas crises epiléticas.

ABSTRACT

Epilepsies are a group of disorders that affects the central nervous system, which have in common recurrent seizures that occur transiently and are caused by abnormal and hypersynchronous neuronal discharges. Throughout the world, about 1% of the population (65 million people) have epilepsy, whereas less developed countries have a higher incidence. Seizures presented by patients with epilepsy can lead to cognitive impairments as a higher incidence of depression, attention deficit, learning impairment, among other disorders. Seizures also generate stigmatization, which in many cases leads to social isolation. Since the cause of epilepsy is multifactorial, the treatment is complex and varied, with different responses between patients. Treatment with antiepileptic drugs gives good results being effective for most patients. However, a number of patients do not respond to treatment with AEDs, requiring further intervention to end the crisis and even reverse the damage caused by them. The non-pharmacological treatments most commonly used involve diets, neural stimulation and surgical removal of the epileptogenic area. Treatment with physical exercise and environmental enrichment have shown to be effective in preventing the onset and in reducing the number of seizures in rodents. In this context, the objective of this thesis was to evaluate the effects of environmental enrichment on the seizure pattern and behavior induced by PTZ in zebrafish. In addition, we aimed to identify factors that influence the zebrafish response in the light/dark test in order to access the anxiety like behavior. The height of the water column has shown critical for zebrafish in choosing between a black and a white compartment. Animals preferred the black side of the aquarium only in the lowest tested water column. Facing a tank with an inclined bottom that generates a deeper side than the other, again the height of the water column has shown significant. In this case the animals appeared to experience a paradigm between remain in the deeper compartment (when it was black or transparent aquarium) or in the black compartment (when the white side was set to be deeper). The light intensity used during the test also proved to be a decisive factor in zebrafish response in the light/dark test. Under an illumination of 70 lux and a depth of 4 cm have remained longer in the black compartment. Using a lighting of 100 lux, animals spend more time exploring the white compartment. When we use 200 lux lighting throughout the entire aquarium or 100 lux in the center of one side and 200 lux in the other side, animals show no preference for neither side. The seizure induced by PTZ in zebrafish was less severe in animals maintained in environmental enrichment than that presented by animals kept in standard aquariums. The environmental enrichment changes the exploratory pattern of zebrafish and prevents the changes observed in the locomotion of animals submitted to the seizure model with PTZ. The PTZ-induced seizure tends to change the social interaction of the zebra fish while the environmental enrichment prevented this behavioral change. The seizure by PTZ as well as exposure for a week on environmental enrichment, do not changed the anxiety-like behavior of zebrafish when tested in the light/dark test. Based on our findings, we conclude that environmental enrichment consists of an intervention with significant potential in the prevention and treatment of seizures, with potential to recover cognitive changes induced by epileptic seizures.

LISTA DE ABREVIATURAS

BE - barren environment

BE+PTZ - barren environment with PTZ-induced seizures

EA - enriquecimiento ambiental

EE - enriched environment

EE+PTZ - enriched environment with PTZ-induced seizures

FAEs - fármacos antiepilépticos

PTZ - pentilenotetrazol

SE - *status epilepticus*

I. INTRODUÇÃO

1. Epilepsias: aspectos gerais e epidemiologia

As epilepsias são definidas como um conjunto de transtornos que alteram temporariamente o funcionamento cerebral, caracterizadas por crises epilépticas recorrentes. As crises epilépticas, por sua vez, são caracterizadas por uma atividade neuronal excessiva e hipsincrônica que podem levar a alterações da consciência com ou sem perda de memória e com intensidade e duração variáveis (BAULAC et al., 2015; ENGEL, 2001). As crises podem ser provocadas por diferentes fatores que gerem um desequilíbrio entre os sistemas de neurotransmissão excitatórios e inibitórios. Tal desequilíbrio da homeostase cerebral pode ser gerado por uma hiperatividade dos neurônios excitatórios, uma diminuição da atividade dos neurônios inibitórios ou ambos os fatores. As crises convulsivas apresentam manifestações tônico-clônicas enquanto as crises de ausência afetam o SNC sem apresentar manifestações motoras. As crises podem ser classificadas segundo a abrangência sobre o SNC, sendo que crises focais ou parciais afetam uma região restrita do cérebro (podendo ou não gerar perda de consciência), enquanto as crises generalizadas acometem ambos hemisférios cerebrais e são acompanhadas de perda de consciência (ELGER; SCHMIDT, 2008). Crises focais, quando não interrompidas, podem gerar crises secundariamente generalizadas.

Estima-se que 65 milhões de pessoas (aproximadamente 1% da população mundial) tenham epilepsia, sendo que a grande maioria desses pacientes é de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (SHINNAR; PELLOCK, 2002;

THURMAN et al., 2011). A incidência de epilepsia é maior durante os anos iniciais de vida, diminuindo durante a fase adulta e voltando a aumentar após os 60 anos de idade (SIDENVALL, R. et al., 1993; STEPHEN; BRODIE, 2000). O número de indivíduos que apresentarão uma crise sem causa definida até os 80 anos de idade está entre 5% e 10%, sendo que destes, aproximadamente metade apresentará uma segunda crise, condição para que o paciente seja considerado epilético (BERG, 2008; WILDEN; COHEN-GADOL, 2012). O desenvolvimento da epilepsia pode ser gerado por uma ampla gama de fatores que incluem infecções do SNC, traumatismos crânio-encefálicos, desordens metabólicas, tumores cerebrais, convulsões neonatais, convulsões febris, malformações congênitas e incidência familiar de epilepsia (COWAN, 2002). Além dos fatores mencionados, o surgimento da epilepsia na maior parte dos pacientes apresenta etiologia desconhecida (BERG et al., 1999; WAALER et al., 2000).

2. Prejuízos cerebrais induzidos por crises epiléticas

Diversos trabalhos têm demonstrado que as crises epiléticas podem alterar a estrutura e a funcionalidade do sistema nervoso central (TURKER et al., 2014).

Ao acompanhar 136 pacientes com epilepsia severa ao longo de mais de 10 anos, THOMPSON; DUNCAN (2005) observaram que a convulsão (crise tônico-clônica generalizada) pode levar ao prejuízo cognitivo. Esta avaliação foi realizada através de testes de memória e de habilidades de execução além do quociente de inteligência. Além disso, pacientes com epilepsia apresentam

uma maior incidência de co-morbidades como depressão, déficit de atenção, alterações comportamentais, comprometimento no aprendizado e no desenvolvimento social (KAPLAN, P. W., 2011; PLIOPLYS; DUNN; CAPLAN, 2007; REILLY, 2011). Mais de 10% dos indivíduos com epilepsia do lobo temporal desenvolvem transtorno obsessivo-compulsivo; adicionalmente, cerca de 14% dos pacientes com este tipo de epilepsia apresentam desordem do pânico (DE OLIVEIRA et al., 2010). Embora as técnicas disponíveis atualmente não permitam a obtenção de resultados conclusivos, alguns trabalhos têm sugerido que crises epiléticas podem induzir morte neuronal em pacientes, uma vez que foi observado um aumento sistêmico de marcadores da neurodegeneração após eventos convulsivos (ROCHA et al., 2007). Desta forma, é plausível hipotetizar que a neurodegeneração esteja relacionada com as alterações cognitivas e comportamentais observadas em pacientes com certos tipos de epilepsia, uma vez que em modelos animais, já foi demonstrado que a morte neuronal está correlacionada com estes processos (HICKS et al., 1993; SUN et al., 2015).

Além das complicações diretamente ligas às crises epiléticas, indivíduos com epilepsia apresentam complicações relacionadas à estigmatização e ao isolamento social (AK et al., 2015; VITEVA, 2013).

3. Tratamento das epilepsias

O objetivo dos tratamentos antiepiléticos é a remissão completa das crises, sem gerar ou gerando o mínimo possível de efeitos colaterais. O principal tratamento e que em geral apresenta bons resultados é a utilização de

fármacos antiepilépticos (FAEs) (ARZIMANOGLU, 2002; WHELESS; CLARKE; CARPENTER, 2005). Por se tratar de um conjunto de transtornos que alteram o funcionamento cerebral, o tratamento da epilepsia é complexo e influencia os pacientes de maneira distinta. Geralmente, a primeira opção de tratamento é os FAEs, que são eficazes na redução ou mesmo na extinção das crises epiléticas para aproximadamente dois terços dos pacientes. Apesar da efetividade em uma grande parcela dos pacientes, nem todos os fármacos funcionam para todos os tipos de crise epilética ou mesmo para todos os pacientes. Neste sentido, o desenvolvimento de tratamentos não farmacológicos que possam cessar as crises ou mesmo diminuir sua ocorrência, e reverter os danos cognitivos relacionados a epilepsia, constituem um importante foco de estudo (ELGER; SCHMIDT, 2008).

4. Tratamento farmacológico das epilepsias

Existe uma ampla gama de FAEs, sendo que alguns são eficazes no controle de uma grande variedade de crises epiléticas e outros possuem especificidade sobre tipos específicos de crises e síndromes epiléticas. Os FAEs convencionalmente utilizados, como fenobarbital, primidona, carbamazepina, fenitoina e valproato são eficazes sobre a grande maioria das crises, diminuindo ou mesmo cessando a ocorrência das crises (BERKOVIC et al., 2007; MARSON et al., 2007; STEINHOFF et al., 2013).

Aproximadamente um terço dos pacientes não apresenta resultados satisfatórios quando tratados com FAEs, mesmo após a substituição do fármaco por uma que tenha como alvo um mecanismo de ação diferente ou

quando duas ou mais substâncias são utilizadas de maneira combinada (KWAN; BRODIE, 2000). Quando não tratadas, as crises epiléticas tendem a se repetir por toda a vida do paciente (NABBOUT; DULAC, 2008). Após o tratamento das crises com fármacos antiepiléticos, em alguns casos, é possível reduzir gradativamente a dose e a frequência de administração do medicamento ou até mesmo cessar sua utilização ao longo dos anos. Para indivíduo que apresentam refratariedade aos fármacos antiepiléticos, tratamentos com dietas restritivas, estimulação neural e até mesmo a cirurgia para remoção do foco epileptogênico são utilizados visando melhorar a qualidade de vida do paciente (CERVENKA; KOSSOFF, 2013; CONNOR et al., 2012; DE TISI et al., 2011).

4.1. Complicações causadas pela utilização de FAEs

Além de não ser eficaz no tratamento de cerca de um terço dos pacientes, o tratamento com FAEs não apresenta benefícios para indivíduos que tiveram comprometimentos cognitivos e comportamentais em decorrência das crises epiléticas sofridas previamente. Adicionalmente, FAEs quando administrados em períodos específicos do desenvolvimento, podem prejudicar a maturação do SNC (CHEN et al., 2009; FARWELL et al., 1990) além de levar a alterações cognitivas e comportamentais (HERMANN et al., 2010; HOLMES, 1997). Outro efeito indesejado de alguns FAEs é o desenvolvimento de hiperhomocisteinemia (acúmulo do aminoácido homocisteína), que está relacionada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BELCASTRO et al., 2010). Alguns dos principais FAEs levam a alteração do peso corporal nos pacientes. Topiramato, felbamato e zonisamida levam a uma

diminuição da massa corpórea (BEN-MENACHEM et al., 2003; BITON, 2003; KETTER; POST; THEODORE, 1999), enquanto valproato, carbamazepina, gabapentina, pregabalina e vigabatina induzem ganho de peso (ARROYO et al., 2004; DRIELING et al., 2007; EASTER; O'BRYAN-TEAR; VERITY, 1997; ISOJARVI et al., 2001; MAGGIONI et al., 2005; VERROTTI et al., 2002). Dentre as alterações de massa corporal, o aumento de peso é o mais preocupante, uma vez que pode levar ao desenvolvimento ou ao agravamento de fatores de risco de diversas doenças (ADAMS et al., 2014; DE MUTSERT et al., 2014; SCHLESINGER et al., 2013). A utilização de fármacos que levem a um aumento de peso é ainda mais crítica para indivíduos epiléticos que geralmente apresentam outros fatores de risco para o desenvolvimento de sobrepeso e obesidade, como: sedentarismo, depressão e alterações psiquiátricas associadas a epilepsia. Está bem estabelecido que indivíduos obesos apresentam uma maior propensão ao desenvolvimento de dislipidemia, aumento da resistência à insulina, hipertensão, diabetes mellitus e aterosclerose (DUBINION; DA SILVA; HALL, 2010; GREENWOOD; WINOCUR, 2005; IASO/IOTF; MCTIGUE et al., 2006).

1. Tratamentos não-farmacológicos

O tratamento com dietas é eficaz para aproximadamente metade dos pacientes que apresentam refratariedade a fármacos antiepiléticos, reduzindo em cerca de 50% a frequência de surgimento de crises (CERVENKA; KOSSOFF, 2013; KOSSOFF, 2004). Dietas cetogênicas consistem em uma ingestão predominante de lipídeos (aproximadamente 90% da ingesta), com quantidades de proteínas e carboidratos reduzidas. A dieta modificada de

Atkins também vem sendo utilizada para o controle de crises epiléticas, consistindo em uma ingesta de lipídeos e proteínas que correspondem à aproximadamente o dobro da dieta normal e restrição quase total de carboidratos (CERVENKA; KOSSOFF, 2013; KOSSOFF; DORWARD, 2008; KOSSOFF et al., 2008). Mais recentemente, a dieta com baixo índice glicêmico, que consiste em ingesta de aproximadamente metade da quantidade de carboidratos e o dobro da quantidade de lipídeos da dieta normal também tem mostrado resultados satisfatórios no controle de crises (CERVENKA; KOSSOFF, 2013).

Assim como o tratamento com dietas, a estimulação neural é eficaz na redução da ocorrência de crise epiléticas para a metade dos pacientes refratários ao tratamento medicamentoso (MORRIS et al., 2013). A estimulação do nervo vago é realizada por um gerador de pulsos elétricos que após implantado no paciente pode ser ajustado pelo neurologista, sem necessidade de novas intervenções cirúrgicas. Os pulsos apresentam, em geral, uma amplitude de 1 a 3 mA, frequência de 30 hertz e duração de 0,5 milissegundos (ZAAIMI et al., 2009; ZAAIMI et al., 2005).

Outra opção de tratamento não-farmacológico, frequentemente utilizada para casos mais graves de refratariedade, é a remoção da área epilética (BERGEN, 2006; DE TISI et al., 2011). Embora a cirurgia envolva riscos ao paciente, a mortalidade é menor do que a observada em pacientes com epilepsia severa. A maior parte dos pacientes submetidos à cirúrgica não desenvolvem novas crises epiléticas quando utilizado um tratamento com FAEs após a intervenção cirúrgica (BERG, 2004). Dependendo da epilepsia, o

índice de remissão para os pacientes que não utilizam tratamento com FAEs após a cirurgia pode ser de 28% (DE TISI et al., 2011). A cirurgia geralmente apresenta melhora na qualidade de vida dos pacientes, embora, dependendo da área removida, pode estar relacionada com perdas cognitivas e comprometimento das funções exercidas pela área cerebral removida.

5. Tratamentos dos danos neuronais e cognitivos causados pelas crises epiléticas

Pesquisas investigando os efeitos da atividade física e do enriquecimento ambiental (EA), tem apresentado benefícios sobre a neurogênese, a memória, o aprendizado, a ansiedade, o estresse crônico, transtornos de humor e crises epiléticas (CHENG et al., 2012; CORDOVA; LOSS; DE OLIVEIRA, 2013; DISHMAN et al., 2006; HUTCHINSON et al., 2012; KRAMER; ERICKSON, 2007; SALVANES et al., 2013; SIMAO; PORTO; NUNES, 2012; WOOD; GLYNN; MORTON, 2011). A neurogênese consiste em um processo fisiológico que ocorre durante toda a vida (MING; SONG, 2011) e está relacionada com a melhora cognitiva (GROSS, 2000; KAPLAN, M. S., 2001; KLEINDIENST et al., 2005). Durante a fase adulta de vertebrados, este processo se restringe a determinadas regiões do SNC (ZUPANC, 2001a;2001b), sendo que em mamíferos, ocorre principalmente na região do giro denteado do hipocampo e na zona subventricular (INTA et al., 2016). Mesmo ocorrendo durante a fase adulta, a taxa de surgimento de novos neurônios em mamíferos não é capaz de reverter os prejuízos cognitivos e comportamentais causados por eventos que levem a uma expressiva perda neuronal, como traumatismos e doenças neurodegenerativas (ZUPANC, 2001a). Algumas neurotrofinas como o NGF

(*nerve growth factor*) e BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) apresentam uma grande influência sobre a neurogênese e sua produção é aumentada pelo aumento dos níveis de atividade física e pela exposição a ambientes enriquecidos (BECHARA; KELLY, 2013; BIRCH; MCGARRY; KELLY, 2013; HONG; LEE; KIM, 2015; SLEIMAN et al., 2016). A capacidade do exercício físico e do ambiente enriquecido em diminuir o surgimento e a severidade de crises epiléticas (ARIDA, R. et al., 1999; ARIDA, R. M. et al., 2013; YANG et al., 2016) além de gerar benefícios sobre a neurogênese (GARTHE; ROEDER; KEMPERMANN, 2016; NOKIA et al., 2016; VAN PRAAG et al., 1999), tornam estas estratégias importantes instrumentos no tratamento dos danos cognitivos causados pelas crises epiléticas.

6. Enriquecimento ambiental

Os protocolos de enriquecimento ambiental (EA) consistem na estimulação física, sensorial, nutricional ocupacional e/ou social com o intuito de proporcionar aos animais a manifestação de comportamentos mais próximos daqueles observado em co-específicos na natureza (BLOOMSMITH; BRENT; SCHAPIRO, 1991). Para roedores, o EA é geralmente criado com o aumento do tamanho das caixas moradia, o aumento no número de animais por caixa, com a adição de brinquedos, túneis, escada e rodas de corrida (CLEMENSEN; DENG; GAGE, 2015). A investigação da influência do EA em animais tem seus primeiros registros na década de 60, quando BENNETT et al. (1996) demonstraram que o EA altera de maneira importante a morfologia e a fisiologia cerebral. Desde então, outros estudos têm demonstrado que o EA é uma intervenção capaz de induzir alterações anatômicas, moleculares,

cognitivas e comportamentais (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; SALE; BERARDI; MAFFEI, 2009). O EA é capaz de gerar benefícios inclusive frente a modelos experimentais de doenças degenerativas, danos cerebrais e desordens do SNC. ILIN; RICHTER-LEVIN (2009), demonstraram que ratos submetidos a um protocolo de estresse na fase jovem, apresentam alterações no padrão exploratório, na ansiedade e na memória semelhantes aos observados em pacientes depressivos e que estas alterações não são observadas em animais mantidos em ambiente enriquecido durante o mês subsequente ao protocolo de estresse. Ratos expostos a um ambiente enriquecido por uma hora diária durante dois meses, quando submetidos a um modelo de hipóxia isquemia no sétimo dia de vida pós-natal, não apresentaram o comprometimento na memória espacial observado nos animais mantidos em ambiente padrão (PEREIRA et al., 2007).

6.1. Enriquecimento ambiental e crises epiléticas

Utilizando um protocolo de EA de 21 dias, YOUNG et al. (1999) demonstraram que esta estratégia é capaz de induzir neurogênese além de levar a uma diminuição da apoptose espontânea que ocorre no hipocampo. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que o EA se mostra eficaz na prevenção das crises epiléticas induzidas por ácido caínico em ratos. Em outro estudo investigando os efeitos do EA sobre a geração de crise epiléticas, AUVERGNE et al. (2002) demonstraram que o EA utilizado por 4 semanas aumenta a resistência no desenvolvimento de crises epiléticas em animais submetidos ao modelo de *kindling* elétrico. A exposição de ratos ao EA é capaz de reverter as alterações no padrão exploratório observado em

animais submetidos ao modelo de *status epilepticus* (SE) induzido por ácido caínico durante períodos iniciais de vida. Além disso, neste mesmo estudo, o EA levou a alterações em genes específicos relacionados com a plasticidade sináptica, a proliferação celular e a consolidação da memória (KOH et al., 2005). Utilizando o modelo de SE induzido por LiCl-pilocarpina, RUTTEN et al. (2002) encontraram um comprometimento na memória espacial que persistiu até a idade adulta, enquanto animais expostos ao EA, após a indução do SE, apresentaram uma melhora significativa no desempenho no labirinto aquático de Morris. Estes achados, demonstram a importância e a versatilidade da utilização do EA, se apresentando como uma intervenção não invasiva e capaz de induzir melhorias em parâmetros moleculares, anatômicos, cognitivos e comportamentais em indivíduos saudáveis e em pacientes acometidos por injúrias que acometem o SNC.

6.2. Enriquecimento ambiental e peixe zebra (*Danio rerio*)

O peixe zebra é um teleósteo da família *Cyprinidae* que na idade adulta chega a 3-4 cm de comprimento. Algumas características favoráveis a este modelo frente a outros animais de laboratório despertaram o interesse crescente científico por esta espécie (SPRAGUE et al., 2003). Entre estas vantagens, podemos citar o baixo custo de manutenção, a possibilidade de criação em espaços menores do que os utilizados para roedores, a grande prole, a facilidade de manipulação e o fato dos animais serem translúcidos durante a fase embrionária (LELE; KRONE, 1996). Devido ao seu pequeno porte, estudos com administração de fármacos injetáveis requerem quantidades significativamente menores do que as necessárias para estudos

em roedores. Além disso, fármacos solúveis em água podem ser facilmente administrados através da água do aquário, sem a utilização de técnicas invasivas. Outro fator que favorece a utilização do peixe zebra como modelo experimental é o fato de possuir o sequenciamento genético disponível e um alto grau de similaridade com o genoma humano e de roedores (BARBAZUK et al., 2000). Já foi demonstrado que quando o peixe zebra pode escolher entre um ambiente padrão e um ambiente enriquecido, os animais preferem permanecer no compartimento contendo plantas e pedras no fundo (SCHROEDER et al., 2014). A investigação dos efeitos da utilização do EA para peixe zebra é bastante restrita e os efeitos benéficos observados em outros modelos animais ainda precisam ser comprovados. A manutenção dos animais em EA levou a uma diminuição do tempo gasto no compartimento branco no teste de branco e preto quando comparados com animais mantidos em ambiente padrão (MANUEL et al., 2015), além de diminuir a locomoção e aumentar o nível de cortisol e a proliferação celular no telencéfalo dos animais (VON KROGH et al., 2010). O EA se mostrou eficaz em aumentar a taxa de fertilidade e de fecundidade dos animais mantidos nesse ambiente, quando comparadas as taxas dos animais mantidos em aquários padrão (WAFER et al., 2016). Assim como em outros modelos animais, a capacidade de aprendizado aparenta ser aumentada pela manutenção do peixe zebra em EA (SPENCE; MAGURRAN; SMITH, 2011).

7. Testes comportamentais em peixe zebra

Com o aumento do interesse em pesquisas com o peixe zebra houve também uma crescente necessidade do desenvolvimento de testes

comportamentais para avaliar as possíveis alterações geradas pelos tratamentos empregados. Neste sentido, alguns autores têm proposto testes comportamentais criados especificamente para o peixe zebra, no entanto, a grande maioria dos testes se constitui em adaptações de teste bem estabelecidos para roedores. No presente trabalho avaliamos o padrão exploratório, a interação com co-específicos e a escototaxia.

7.1. Open Tank

O teste de Open Tank se propõe a avaliar a locomoção e a exploração dos peixes, sendo que inicialmente os animais passam mais tempo no fundo do aquário (similar ao comportamento dos roedores de explorar próximo a parede no campo aberto) e progressivamente passam a explorar a parte superior (similar ao que ocorre com a exploração do centro da arena no campo aberto para roedores) (EGAN et al., 2009; ROSEMBERG et al., 2011). Este padrão comportamental foi observado em animais controle e em animais submetidos a tratamentos com diferentes composto ansiolítico e ansiogênicos (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; CACHAT et al., 2010; EGAN et al., 2009; GROSSMAN et al., 2010; LEVIN; BENCAN; CERUTTI, 2007; ROSEMBERG et al., 2011).

7.2. Preferência Social

A preferência social do peixe zebra tem sido avaliada por diferentes protocolos (DREOSTI et al., 2015; PHAM et al., 2012; SAVERINO; GERLAI, 2008). No ambiente natural, o peixe zebra é um animal de cardume. A convivência em cardume gera algumas vantagens, incluindo a diminuição do

risco de predação, facilidade na reprodução da espécie, vigilância do grupo, troca de informações entre os indivíduos e a alimentação (GRIFFITHS et al., 2004; LEDESMA; MCROBERT, 2008; MORRELL; JAMES, 2008). Desta forma, quando é oferecida a opção de estar próximo a um co-específico (ambiente seguro) ou isolado (ambiente aversivo), os animais passam mais tempo interagido com outros animais da mesma espécie. O teste de preferência social tem por objetivo, avaliar o tempo de interação do animal que está sendo testado com outros animais da mesma espécie. Neste teste, o animal é exposto a um aquário que fica posicionado no centro e faz divisa com dois aquários posicionados em suas laterais. Em dos aquários laterais contém um ou mais animais da mesma espécie, enquanto o outro compartimento permanece vazio, com predador, com objetos ou com animais da mesma espécie com alterações genéticas que alterem seu fenótipo (alterações no padrão das listras ou da cor) (BARBA-ESCOBEDO; GOULD, 2012; ENGESZER; RYAN; PARICHY, 2004; GROSSMAN et al., 2010; SAVERINO; GERLAI, 2008; TOMS; ECHEVARRIA, 2014). Animais controle, mantidos em temperatura ambiente e criados em grupos, quando testados individualmente, tendem a passar mais tempo próximos ao compartimento contendo um ou mais co-específicos (DREOSTI et al., 2015; PHAM et al., 2012; SAVERINO; GERLAI, 2008).

7.3. Claro/escuro

Em roedores, o teste de claro/escuro, está bem estabelecido como uma ferramenta para avaliar o comportamento tipo ansioso dos animais (ARRANT; SCHRAMM-SAPYTA; KUHN, 2013). Por possuírem hábitos noturnos, roedores

tendem a explorar mais o compartimento escuro (seguro), passando pouco tempo no compartimento claro (aversivo). Neste teste, aos animais são expostos a uma arena que é composta por um compartimento escuro (que pode ou não ser fechado no topo) e outro compartimento que é mais claro e mais amplo. Os dois compartimentos são separados por uma parede central, que possui uma porta que possibilita a livre exploração entre eles. O tempo de exploração em cada compartimento e o número de trocas de um compartimento para o outro são registrados e servem como indicativo dos níveis de ansiedade dos animais. Fundamentados neste teste, alguns pesquisadores têm proposto um aquário configurado com um compartimento claro/branco e outro escuro/preto, para avaliar a ansiedade em peixe zebra. Em um primeiro trabalho, SERRA; MEDALHA; MATTIOLI (1999) encontraram uma clara preferência pelo lado escuro do aparato, com os animais quase não explorando o compartimento claro. Baseados neste primeiro trabalho, outros pesquisadores buscaram avaliar a preferência do peixe zebra no teste claro/escuro, sendo que MAXIMINO; DE BRITO; et al. (2010) e BLASER; CHADWICK; MCGINNIS (2010) também demonstraram uma preferência do peixe zebra pelo lado escuro do aparato. No entanto, alguns trabalhos encontraram uma aversão pelo compartimento escuro, sendo que os peixes passaram aproximadamente 60% do tempo no lado claro (CHAMPAGNE et al., 2010; GERLAI et al., 2000). A aversão ao compartimento escuro, se mostrou ainda maior em peixes jovens (seis dias após a fertilização), onde os animais permaneceram menos de 1/10 do tempo total do teste neste compartimento (STEENBERGEN; RICHARDSON; CHAMPAGNE, 2011). Adicionalmente, BLASER et al. (2010) identificaram duas populações distintas de peixes, sendo

que uma apresenta uma evidente preferência pelo compartimento escuro e outra na qual a preferência por este compartimento não é tão intensa. Estes resultados conflitantes podem estar relacionados a variações no aparato utilizado ou mesmo por diferenças nos protocolos (como por exemplo: tempo de avaliação, ambientação com o aparato e hora do dia que os animais foram testados). WANG et al. (2014) demonstraram que o horário em que o teste é realizado, pode influenciar de maneira decisiva a preferência do peixe zebra pelo compartimento claro ou escuro. Neste trabalho, os animais passam mais tempo no compartimento claro durante o período correspondente ao dia (8h-18h). Gradativamente, a preferência passou a se pelo compartimento escuro (após as 20h, correspondente à noite, horário em que as luzes eram apagadas durante o período de aclimatação antes do início dos experimentos) e atingindo um pico de preferência por esse compartimento às 2h da manhã. A altura do nível da água também se mostrou determinante sobre a escolha do peixe zebra entre dois compartimentos. Os animais preferem permanecer em compartimentos que possibilitem ficar mais longe da superfície do que compartimentos com pedras no fundo do aquário (BLASER; GOLDSTEINHOLM, 2012; BLASER; ROSEMBERG, 2012). Este comportamento provavelmente está relacionado com a necessidade de, na natureza, evitar ataques aéreos de predadores, gerando um tempo de fuga maior e a possibilidade de se abrigar próximo a substratos no fundo. Em função da diversidade de resposta do peixe zebra quando exposto a um aquário metade branco e metade preto, é fundamental determinar os fatores que levam a alteração da resposta, para que este teste seja utilizado com maior reprodutibilidade. Sendo o comportamento tipo ansiedade um dos fatores que

podem ser alterados pelas crises induzidas por PTZ, é fundamental melhor caracterizar o teste de claro/escuro para avaliar este parâmetro em animais submetidos a modelos de crises epiléticas.

II. Objetivos

Objetivo geral

Esta tese de doutorado teve como objetivo avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre o padrão de crises epilépticas e comportamento induzidos por PTZ na fase adulta, além de identificar fatores que influenciam a resposta do peixe zebra no teste de claro/escuro visando acessar o comportamento tipo ansiedade.

Objetivos específicos

Capítulo I

- Caracterizar os fatores que podem estar relacionados com as discrepâncias encontradas no teste de claro/escuro proposto para o peixe zebra.
- Propor um protocolo replicável de teste comportamental de claro/escuro para o peixe zebra.

Capítulo II

- Avaliar a influência exercida pelo enriquecimento ambiental sobre o padrão de crises epilépticas induzidas por PTZ em peixe zebra;

- Avaliar a influência da crise epiléptica induzida por PTZ sobre a atividade locomoção e exploratória do peixe zebra e a possível prevenção destas alterações através do enriquecimento ambiental.
- Avaliar possíveis alterações na preferência por co-específicos de peixes zebra adultos submetidos a crise epiléptica induzida por PTZ em animais previamente expostos a um protocolo de enriquecimento ambiental.
- Verificar a influência da crise epiléptica induzida por PTZ sobre a preferência do peixe zebra adulto, submetido a um protocolo de enriquecimento ambiental, no teste de claro/escuro.

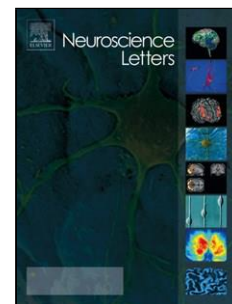
III. RESULTADOS

Capítulo I

Accepted Manuscript

Title: WATER COLUMN DEPTH AND LIGHT INTENSITY
MODULATE THE ZEBRAFISH PREFERENCE RESPONSE
IN THE BLACK/WHITE TEST

Author: Sandro Daniel Cordova Thain´a Garbino dos Santos´



Diogo Losch de de Oliveira

PII: S0304-3940(16)30138-0
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.neulet.2016.03.008>
Reference: NSL 31901

To appear in: *Neuroscience Letters*

Received date: 22-9-2015
Revised date: 2-3-2016
Accepted date: 3-3-2016

Please cite this article as: Sandro Daniel Cordova,´ Thaina´ Garbino dos Santos, Diogo Losch de de Oliveira, WATER COLUMN DEPTH AND LIGHT INTENSITY MODULATE THE ZEBRAFISH PREFERENCE RESPONSE IN THE BLACK/WHITE TEST, *Neuroscience Letters*

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.03.008>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

WATER COLUMN DEPTH AND LIGHT INTENSITY MODULATE THE ZEBRAFISH PREFERENCE RESPONSE IN THE BLACK/WHITE TEST

Sandro Daniel Córdova *, Thainá Garbino dos Santos, Diogo Losch de Oliveira

Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*** Address for correspondence:**

Sandro Daniel Córdova

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo.

Zip code: 90035-003

Porto Alegre, RS, BRAZIL

Phone: +55 51 33085555

Fax: +55 51 33085540

E-mail: sandrocordova@gmail.com

Highlights

- Alterations in water column depth modify zebrafish preference in the black/white test
- Different light intensity changes zebrafish preference in the black/white test
- Zebrafish preference for black or white was influenced by variation in the experimental conditions

Currently, the black/white preference test has been used to evaluate anxiety-like behaviors in zebrafish. However, several inconsistent results have been reported across literature. Since animal behavior can be influenced by several environmental factors, the main goal of the present study was to investigate the influence of different water column depths and light intensities on zebrafish behavioral responses in the black/white test. On a 4 cm water column depth, animals spent more time in the black than in the white compartment. However, when animals were tested in an 8 cm water column, no significant difference was found. Using an inclined acrylic floor inside the aquarium, animals spent more time in the deep compartment when this was black. However, there is no difference in time spent in each compartment when the deeper compartment was white. For light intensity test, animals showed preference for the white compartment only when both compartments were illuminated with 100 lux. For the others illumination settings, there was no difference in the compartment

preference. In conclusion, our results suggest that variations in water column depth and light intensity can modulate zebrafish preference in the black/white test. These variations may be implicated in the discrepancies observed in literature.

Keywords: black/white test; zebrafish preference

In the last decade, zebrafish has become an emergent vertebrate experimental model for studies in behavioral neuroscience [25]. This model has been proposed for the assessment of several psychiatric disorders, with putative application in drug development research [11]. Since zebrafish shares a high degree of genetic homology with human genome [10] and presents neurotransmitter systems evolutionarily conserved [18], it has been employed for studies evaluating the neurobiological basis of behavior [25]. In this context, a large number of behavioral tasks have been proposed and developed for this species, which includes tests for learning and memory [5, 12], social behavior [6], locomotion and exploration [19], and anxiety-like behaviors [1, 4, 14, 20].

The most common task proposed for measuring anxiety-like behaviors in zebrafish is the black/white preference test. It consists in a tank with one side covered in black and other side white [22], and it was based on the zebrafish natural aversive quality for the brightly lit environments, which shapes a conflict situation in which the animal must deal with its natural tendency to explore in the face of an unpleasant environment.

Although a preference for the darker portion of the apparatus was initially proposed by [22] and further validated by Maximino and colleagues [13, 15], behavioral responses in this task appear to be very variable across literature.[9] observed a preference for the light environment instead dark one using an apparatus illuminated with diffuse light from fluorescent lights and other covered with cardboard paper on all sides and the top. Similar results were obtained by [7], in which animals exposed to a black/transparent tank spent more time on the transparent side of the apparatus. Another interesting result

was observed by Blaser, et al. [1] by using a black- and white-divided apparatus. Authors observed two distinct populations of zebrafish: one presenting a high-avoidance response for the white compartment and another one showing a low-avoidance behavior. Although the discrepancy observed in the literature regarding zebrafish preference is frequently attributed to different configurations and dimensions of the tank (black/transparent instead black/white tank) [14], it is possible that other factors such as the water column depth and illumination levels inside the apparatus can be strongly affecting the zebrafish behavioral responses in the black/white test [17, 21].

This hypothesis may be corroborated by the works performed by Stephenson, et al. [23] and Blaser and Goldsteinholm [2]. In the first article, authors observed that zebrafish spend more time in the white half of a rotative cylindrical glass tank when animals were submitted to lower illumination levels in the apparatus. In contrast, when higher illumination levels were applied, animals preferred the black half. Thus, it is possible that the preference of zebrafish for dark environments may be an escape response induced by higher illumination levels on the apparatus. The second work observed that zebrafish presents a strong preference for deeper areas of a visual cliff modified apparatus, which appears to be driven by an avoidance of the water surface. Therefore, it is also possible that zebrafish are driven to approach to the black compartment (supposed to be safer) due to elevated anxiety levels induced by a reduced water column depth.

Although these two above mentioned works points to notion that water column depth and illumination levels can modulate the zebrafish behavioral

response, the influence of these two variables on zebrafish preference in the black/white test was not verified. Thus, the main goal of the present study was to investigate the influences of different light intensities and water column depths on behavioral responses of zebrafish in the black/white preference test. These two parameters were chosen because they consist in variables that are often superficially described across zebrafish behavioral studies using black/white test.

METHODS

Subjects

Adult (>8 months) wild-type zebrafish of both sexes (120 animals) were used. Animals were acquired from a commercial supplier (Delphis, RS, Brazil). Before the onset of behavioral tests, animals were acclimated during 2 weeks in a 10 L aquarium with a recirculating filtration system at a density of 3 animals/liter. The temperature was kept at 28 ± 1 °C and the pH at $7,5 \pm 0,5$. A 14/10-h light/dark cycle was used. The ammonia levels were equivalent to 0 ppm and the conductivity equal to 500 $\mu\text{s}/\text{cm}$. Animals were fed 3 times a day with live *Artemia sp.* (*Artêmia Salina do RN, Brazil*). The manipulation and animal care were conducted according to the National Institute of Health Guide For Care and Use of Laboratory Animals and aimed to minimize the number of animals used as well the discomfort or suffering. All experimental procedures were approved by Ethic Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol number #26568).

Apparatus

For all experiments, the size of the tanks was 30 cm x 15 cm x 10 cm (length x width x depth). Two different tanks were used. One tank was divided in two distinct compartments, one side white and other black covered. Both compartments were covered with contact paper (black/white) stuck inside the aquarium to avoid reflection of animals in the wall (to avoid a putative social

interaction with the mirror image). The other tank was totally transparent (named as “transparent tank”), which was hidden behind a frosted acrylic wall to prevent the visualization of the experimenter by animals. Since the facility tanks had a white floor, a pilot study was performed using a black/white tank with white floor or a half white and a half black floor. There was no difference between these two test tanks (data not shown), thus a white acrylic floor was used for all experiments. In Experiments 1 and 2, the illumination in the center of each compartment was 70 ± 2 lux (room illumination). In Experiment 3, the light intensity in the center of each compartment was setting up to 100 or 200 lux (see detailed description bellow). Figure 1 illustrates the experimental design and the apparatuses used for each experiment.

Testing Procedures

Animals were fed 1 hour before the beginning of the test and they were habituated with the experimental room for at least 30 minutes in a 3 L tanks at a density of 3 animals/L. In order to avoid the stress response resulting from animal isolation, always remaining 3 animals in each home tank at the end of the test (these animals were not used for the experiments). For all tests, animals were individually introduced in the center of the apparatus. Animal behavior was recorded during 360 seconds. Each experimental group corresponds to the sum of 3 different animal batches, which were tested in different experimental days. This procedure was performed to reduce the

influence of the testing day on the animal response. All tests were performed between 9:00 am and 12:00 am.

Experiment 1

In order to evaluate the influence of water column depth on zebrafish preferential response in the black/white preference test, animals were tested under two different water columns depths: 8 or 4 cm depth.

Experiment 2

In order to assess whether our fish showed the natural preference for deep environments already described in the literature, animals were tested in a transparent tank with an inclined acrylic floor put inside the aquarium for generating different water column depths: 2x4 cm and 4x8 cm (paradigm 1) (Fig. 1). In order to evaluate the influence of water column depth over the zebrafish context preference (black/white), this inclined acrylic floor was put inside the black/white tank (Fig. 1). The depth was fixed at 2x4 cm for paradigm 2 and 4x8 cm for paradigm 3. For both experimental paradigms, each compartment was tested as deeper.

Experiment 3

In order to evaluate the influence of light intensity on the context preference of zebrafish, animals were submitted to two different testing paradigms. For the paradigm 1, equal light intensities (100 or 200 lux) were applied for both compartments of the apparatus. For the paradigm 2, fish were subjected to different light intensities between compartments: 100 lux for the white compartment and 200 lux for the black; or 200 lux for white compartment and 200 lux for the black. The light intensity was measured in the center of each compartment by using a lux meter. For all paradigms, the water column depth was 4 cm.

Behavioral measures

For all experiments, the video was recorded at 30 frames per second by using a video camera connected to a computer. The following end point parameters were analyzed: the total time spent in each compartment, the total number of midline crossings. The ANY-Maze® video-tracking system (Stoelting, CO) was used for all behavioral measures. For each behavioral test the N was equal to 10.

Statistical Analysis

Each Experiment was statistically analyzed independently. The percentage of total time spent in each compartment and the total number of midline crossings were expressed as mean \pm S.E.M. For Experiment 2, data on the number of

midline crossings were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test. Another data were analyzed by Student's single-sample ttest. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Experiment 1

On a 4 cm water column depth, animals spent more time in the black than in the white compartment ($p=0.0015$, $t=4,734$; Fig. 2A). When animals were tested in an 8 cm depth water column, no significant difference was found in the percentage of the total time spent in each compartment ($p=0.8742$, $t=0,1634$; Fig. 2B). The number of midline crossings was similar for both water column depths (16.3 ± 2.7 for 4 cm; 20.6 ± 2.4 for 8 cm; $p=0.2529$, $t=0,9636$ Fig.

2C).

Experiment 2 – Paradigm 1

When fish were exposed to the transparent tank with an inclined acrylic floor inside the aquarium, animals spent more time in the deep than in the shallow compartment ($p<0.0001$ for 4x8 cm, $t=6,640$ Fig. 3A; $p=0.0001$ for 2x4 cm, $t=5,563$; Fig. 3D).

Experiment 2 – Paradigms 2 and 3

For both water column depths, when black compartment was defined as deep animals spent more time in this compartment when compared to the white ($p=0.0015$ for 4x8 cm; $p=0.0013$ for 2x4 cm). However, when the deeper

compartment was the white, there is no difference in the percentage of time spent in each compartment by animals ($p=0.0015$ for 4x8 cm; $p=0.0013$ for 2x4 cm).

In comparison to the transparent tank, animals exposed to the tank with the white compartment as deeper presented an increased number of midline crossings ($p=0.0311$). However, when black compartment was defined as deeper the number of midline crossings performed by animals did not differ from the white deeper and transparent configurations ($F_{2,27}=3.735$; $p=0.2089$ and $0,6112$, respectively). Results were very similar for both water column depths (2x4 and 4x8 cm) (Fig. 3C and F).

Experiment 3 – Paradigms 1 and 2

In the illumination test, animals showed preference for the white compartment only when 100 lux was applied for both compartments ($p=0.0210$, $t=2,791$ Fig. 4E). For the others illumination settings, animals did not show preference for any compartment of the tank (Fig. 4A $p=0.8413$, $t=0,2069$; B $p=0.2287$, $t=1,292$; and D $p=0.0936$, $t=1,875$). There is no difference in the number of midline crossings when animals were exposed to 200 lux in one compartment and 100 lux in another, independently of the compartment color ($p=0.3001$, Fig. 4C). Animals submitted to a light intensity of 200 lux for both compartment presented a slight increase in the number of midline crossings when compared to animals exposed to 100 lux ($p=0.0411$, Fig. 4F).

DISCUSSION

Here we demonstrated that zebrafish behavioral response in the black/white test could be modulated by variations in the light intensities and water column depths. Although several works have already extensively evaluated the zebrafish behavior in the black/white preference test, discrepancies regarding fish preference have been reported in the literature. These discrepancies are often attributed to different configurations of the tank (such as black/white or black/transparent divided tanks) [14], however variations in the experimental conditions across literature can also strongly influence the preference of zebrafish in this task.

In this context, our first working hypothesis was that variations in the water column depth could modify the zebrafish response in the black/white preference test. In Experiment 1, animals demonstrated a strong preference for the black compartment (Fig. 2) of the tank when a reduced water column depth (4 cm) was used. However, when animals were submitted to an 8 cm water column depth, both sides of the apparatus were explored equally. This result is in contrast with previous works performed by Maximino, et al. [13] and Stewart, et al. [24], where both authors reported a higher preference of zebrafish for the black compartment in a 10 and 12 cm water column depth, respectively. The discrepancy between literature and result observed in our work may be attributed to differences in the apparatus illumination during the test, since Stewart, et al. [24] used a 500 lux of light intensity to perform the test and we used 75 lux. However, further studies are warranted for evaluating the

interaction between light intensity and water column depth on preferential response of zebrafish in the black/white test.

The absence of zebrafish preference in our 8 cm water column depth may be supported by the fact that adult zebrafish tend to avoid water surface and, consequently, spent more time in deeper areas of a visual cliff modified apparatus Blaser and Goldsteinholm [2]. Moreover, Frisch and Anderson [8] showed that shallow water induces a significant increase in circulating levels of cortisol in coral trout 30 min after the onset of the stressor, which remained elevated during 4 h. Thus, it is possible to hypothesize that the shallow water used in the Experiment 1 could induce an elevation of cortisol levels in zebrafish, which may increase the anxiety levels, and consequently exacerbate the preference of animals by the black compartment (which is supposed to be the safer compartment).

In experiment 2, we investigated the influence of a depth gradient on zebrafish preferential response. Our results revealed a clear influence of the depth gradient on the zebrafish preferential response. While animals spent more time in the black compartment when it was set as deep, there was no difference in the time spent in each compartment when white was defined as deep (Fig. 3B and D). This data may suggest that animals may exhibit a putative choice's conflict when two distinct stimuli are introduced: preference for the context (black/white) or depth. This hypothesis may be plausible since animals presented an elevated number of midline crossings when the white compartment was set deep (Fig. 3C and F). In addition, this result points the notion that the aversion of animals by the white compartment (or approach for

the black compartment) may be a conditional response induced by fear- or anxiety-inducing stimulus. This speculation may be supported by fact that when animals were tested in the transparent tank, they clearly preferred the deep side of the apparatus, similar to previous works [2, 9]. Similar results was reported by Blaser and Rosemberg [4]. Authors observed a significant overall avoidance of fish for the shallow side of the apparatus when they used a transparent tank. However, in contrast with our results these authors did not observe a significantly influence of water column depth on color preference, which may be due to the distinct volume of water used in each apparatus.

The experiment 3 was designed to test our hypothesis that different light intensities may also influence the preferential responses of zebrafish in the black/white test. For this, we used a water column depth of 4 cm. Although we expected a clearly preference for the less illuminated side of the apparatus, animals spent similar time in each compartment when we applied high light intensity for both compartments (200 lux) or alternated low/high light intensities (100/200 lux, respectively) between compartments (Fig. 4A, B and D). The most surprisingly result was found when 100 lux was applied for both sides, animals spend more time in the white compartment rather than in the black one. This result was opposite to those found in Experiment 1, where we used a room illumination of 75 lux. Although it is an unexpected result, it provides some explanations for the differences in preferential response of zebrafish for black/white compartments found in the literature. Light intensity-induced fluctuations in the zebrafish preference for black compartment was already found by Stephenson, et al. [23]. Moreover, other studies have demonstrated

that zebrafish exhibited phototaxis (preference for light) when illumination was manipulated [3], however, the variation of light intensity was around 10 fold. Some morphological studies have demonstrated that photoreceptor density is not constant across the zebrafish retina and rod cells are twofold more populated in the ventral than in dorsal retina [16]. It is possible that zebrafish possess a higher degree of responsiveness to small variations in environmental light intensity, which in turn may account for the differences in the behavioral responses between Experiment 1 and 3. Other hypothesis is that zebrafish, due to its diurnal activity, presents less aversion to bright environments than that observed in rodents, which have a predominantly nocturnal activity.

In the present work, we show that variation in water column depth is crucial over the zebrafish response when exposed to a new apparatuses. Additionally, light intensity may change the zebrafish preference in a black/white aquarium. These findings, in addition to provide important information about the zebrafish preference, help to understanding the differences found in literature when testing anxiety-like behavior through the black/white test. In addition, the current report highlights the importance of researches for taking a rigid control of each interfering factors as well as emphasizes the need to develop a more detailed and standardized protocol to evaluate the zebrafish behavior in the black/white test. Moreover, since zebrafish is a relatively recent animal model for Behavioral Neuroscience, the present work reinforces the importance of authors in describing in detail all experimental procedures employed for zebrafish behavioral studies, in order to allow the data replication as well as the increase of its relevance for the scientific community.

REFERENCES

- [1] R.E. Blaser, L. Chadwick, G.C. McGinnis, Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*), *Behav Brain Res* 208 (2010) 56-62.
- [2] R.E. Blaser, K. Goldsteinholm, Depth preference in zebrafish, *Danio rerio*: control by surface and substrate cues, *Animal Behavior* 83 (2012) 953–959.
- [3] R.E. Blaser, Y.M. Penalosa, Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test, *Physiol Behav* 104 (2011) 831-837.
- [4] R.E. Blaser, D.B. Rosemberg, Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test, *PLoS One* 7 (2012) e36931.
- [5] D. Braida, L. Ponzoni, R. Martucci, F. Sparatore, C. Gotti, M. Sala, Role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) on learning and memory in zebrafish, *Psychopharmacology* 231 (2014) 1975-1985.
- [6] C. Buske, R. Gerlai, Diving deeper into Zebrafish development of social behavior: analyzing high resolution data, *J Neurosci Methods* 234 (2014) 66-72.
- [7] D.L. Champagne, C.C. Hoefnagels, R.E. de Kloet, M.K. Richardson, Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research, *Behav Brain Res* 214 (2010) 332-342.
- [8] A.J. Frisch, T.A. Anderson, The response of coral trout (*Plectropomus leopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress, *Fish Physiol Biochem* 23 (2000) 23-34.
- [9] R. Gerlai, M. Lahav, S. Guo, A. Rosenthal, Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects, *Pharmacol Biochem Behav* 67 (2000) 773-782.
- [10] K. Howe, M.D. Clark, C.F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J.E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J.C. Barrett, R. Koch, G.J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L.T. Quintais, J.A. Guerra-Assuncao, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J.H.

Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langley, S.F. Maguire, G.K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J.

Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Elliot, G.

Threadgold, G. Harden, D. Ware, S. Begum, B. Mortimore, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Lloyd, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K.

Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D.

Manthravadi, S. Nichol, G. Barker, S. Whitehead, M. Kay, J. Brown, C. Murnane, E. Gray, M. Humphries, N. Sycamore, D. Barker, D. Saunders, J. Wallis, A. Babbage, S. Hammond, M. Mashreghi-Mohammadi, L. Barr, S. Martin, P. Wray, A. Ellington, N. Matthews, M. Ellwood, R. Woodmansey, G. Clark, J. Cooper, A.

Tromans, D. Grafham, C. Skuce, R. Pandian, R. Andrews, E. Harrison, A. Kimberley, J. Garnett, N. Fosker, R. Hall, P. Garner, D. Kelly, C. Bird, S. Palmer, I.

Gehring, A. Berger, C.M. Dooley, Z. Ersan-Urun, C. Eser, H. Geiger, M. Geisler, L. Karotki, A. Kirn, J. Konantz, M. Konantz, M. Oberlander, S. Rudolph-Geiger, M. Teucke, C. Lanz, G. Raddatz, K. Osoegawa, B. Zhu, A. Rapp, S. Widaa, C. Langford, F. Yang, S.C. Schuster, N.P. Carter, J. Harrow, Z. Ning, J. Herrero, S.M.

Searle, A. Enright, R. Geisler, R.H. Plasterk, C. Lee, M. Westerfield, P.J. de Jong,

L.I. Zon, J.H. Postlethwait, C. Nusslein-Volhard, T.J. Hubbard, H. Roest Crolius, J. Rogers, D.L. Stemple, The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome, *Nature* 496 (2013) 498-503.

- [11] G.J. Lieschke, P.D. Currie, Animal models of human disease: zebrafish swim into view, *Nature reviews. Genetics* 8 (2007) 353-367.
- [12] T. Lucon-Xiccato, M. Dadda, Assessing memory in zebrafish using the one-trial test, *Behavioural processes* 106 (2014) 1-4.
- [13] C. Maximino, T.M. de Brito, R. Colmanetti, A.A. Pontes, H.M. de Castro, R.I. de Lacerda, S. Morato, A. Gouveia, Jr., Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis, *Behav Brain Res* 210 (2010) 1-7.
- [14] C. Maximino, T.M. de Brito, A.W. da Silva Batista, A.M. Herculano, S. Morato, A. Gouveia, Jr., Measuring anxiety in zebrafish: a critical review, *Behav Brain Res* 214 (2010) 157-171.
- [15] C. Maximino, T. Marques de Brito, C.A. Dias, A. Gouveia, Jr., S. Morato, Scototaxis as anxiety-like behavior in fish, *Nat Protoc* 5 (2010) 209-216.
- [16] L. Nawrocki, R. BreMiller, G. Streisinger, M. Kaplan, Larval and adult visual pigments of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, *Vision Res* 25 (1985) 1569-1576.
- [17] L.O. Pereira, I.C. da Cunha, J.M. Neto, M.A. Paschoalini, M.S. Faria, The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze, *Behav Brain Res* 159 (2005) 55-61.
- [18] E.P. Rico, D.B. Rosemberg, K.J. Seibt, K.M. Capiotti, R.S. Da Silva, C.D. Bonan, Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets, *Neurotoxicology and teratology* 33 (2011) 608-617.
- [19] D.B. Rosemberg, M.M. Braga, E.P. Rico, C.M. Loss, S.D. Cordova, B.H. Mussulini, R.E. Blaser, C.E. Leite, M.M. Campos, R.D. Dias, M.E. Calcagnotto, D.L. de Oliveira, D.O. Souza, Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol, *Neuropharmacology* 63 (2012) 613-623.
- [20] D.B. Rosemberg, E.P. Rico, B.H. Mussulini, A.L. Piato, M.E. Calcagnotto, C.D. Bonan, R.D. Dias, R.E. Blaser, D.O. Souza, D.L. de Oliveira, Differences in spatiotemporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-

- period confinement into dark and bright environments., PLoS One 6 (2011) e19397.
- [21] J. Sackerman, J.J. Donegan, C.S. Cunningham, N.N. Nguyen, K. Lawless, A. Long, R.H. Benno, G.G. Gould, Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of *Danio rerio* Line, International journal of comparative psychology / ISCP ; sponsored by the International Society for Comparative Psychology and the University of Calabria 23 (2010) 43-61.
- [22] E.L. Serra, C.C. Medalha, R. Mattioli, Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment, Braz J Med Biol Res 32 (1999) 1551-1553.
- [23] J.F. Stephenson, K.E. Whitlock, J.C. Partridge, Zebrafish preference for light or dark is dependent on ambient light levels and olfactory stimulation, Zebrafish 8 (2011) 17-22.
- [24] A. Stewart, C. Maximino, T.M. de Brito, A.M. Herculano, A. Gouveia, Jr., S. Morato, J. Cachat, S. Gaikiwari, M. elegante, P. Hart, A.V. Kalueff, Neurophenotyping of adult zebrafish using the light/dark box paradigm., Zebrafish neurobehavioral protocols (2010).
- [25] G. Sumbre, G.G. de Polavieja, The world according to zebrafish: how neural circuits generate behavior, Frontiers in neural circuits 8 (2014) 91.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Diagram illustrating the experimental design. In Experiment 1, animals were exposed to the black/white tank with two different depths: 4 or 8 cm. In Experiment 2 animals were submitted to a depth gradient, which was generated by an incline floor put inside de apparatus (black/white or transparent tanks). The Experiment 3 was designed to investigate the influence of different light intensities on the zebrafish behavioral responses.

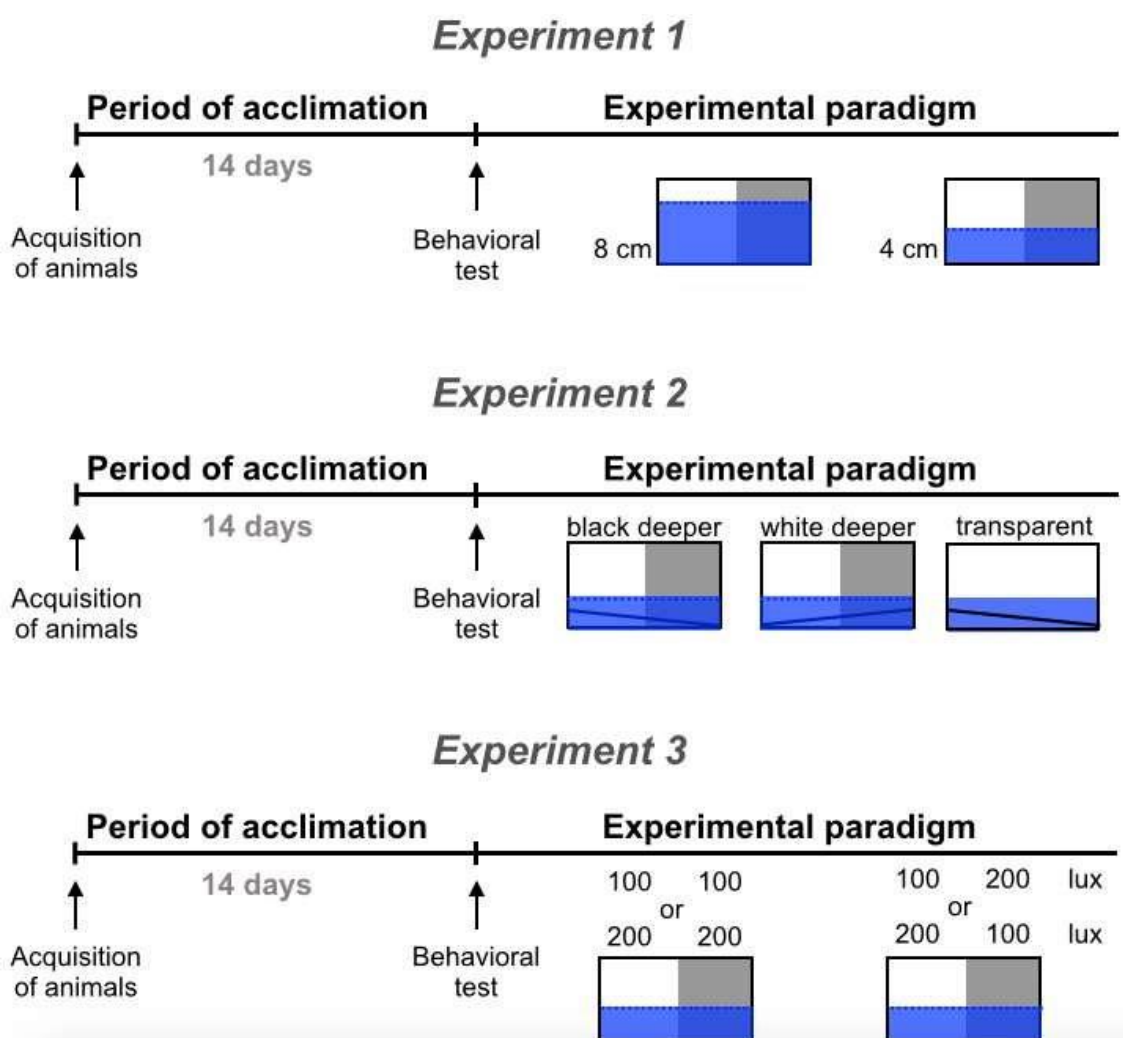


Fig. 2. Effect of different depths on zebrafish behavioral responses in the black/white test. Data were presented as the percent of total time spent in white or black compartments and the number of midline crossings for each configuration. * indicates $p < 0.05$; $N = 10$.

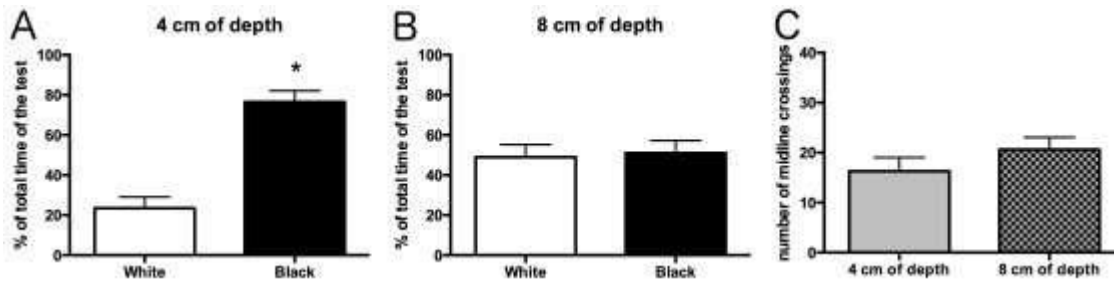


Fig. 3. Effects of different depths gradient on zebrafish behavioral responses in the black/white test. Data were shown as the percent of total time spent in each compartment and the number of midline crossing for each configurations: 4 cm x 2 cm depths (A-C) and 8 cm x 4 cm depths (D-F). * indicates $p < 0.05$; $N = 10$.

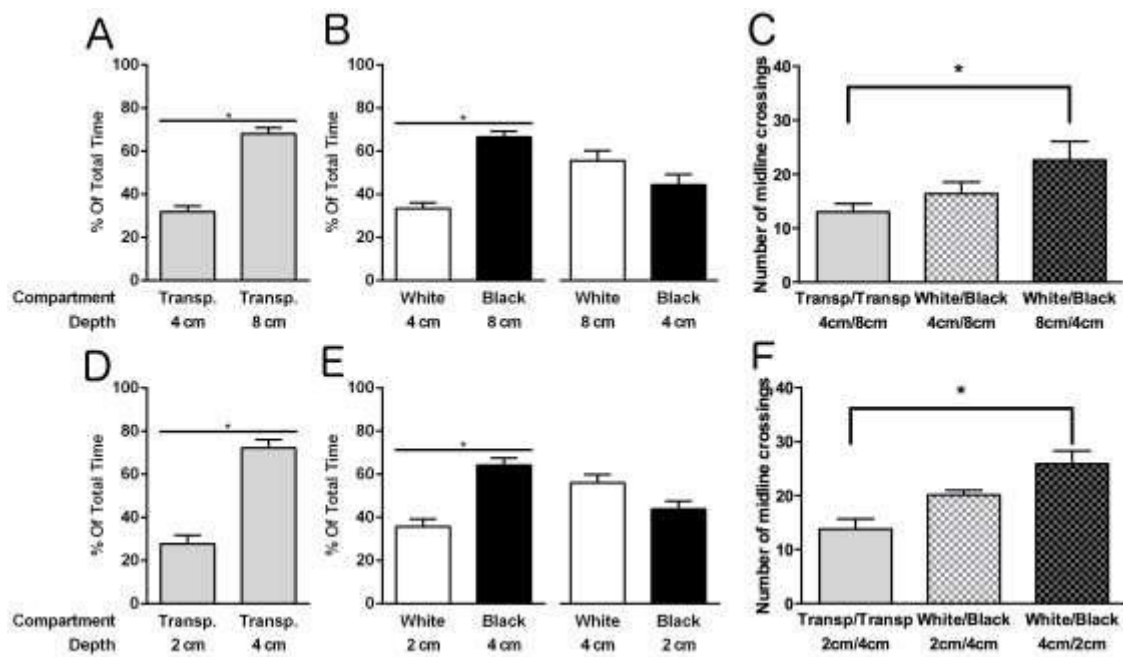
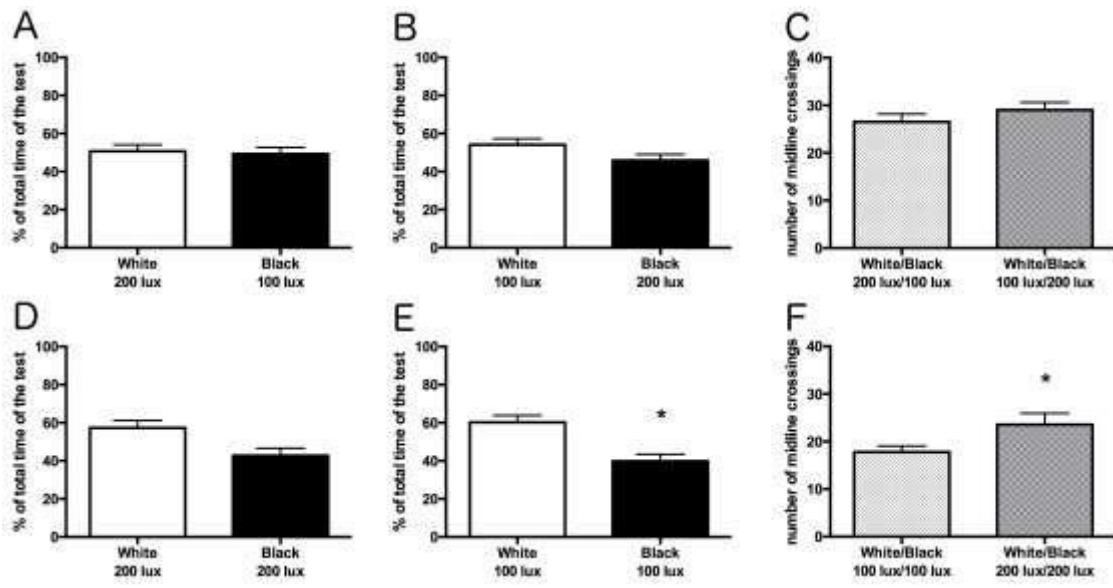


Fig. 4. Effect of different light intensities on zebrafish behavioral responses in the black/white test. Data show the percent of total time spent in each compartments under: A) 200 lux in white and 100 lux in black compartment; B) 100 lux in white and 200 lux in black compartment; C) 200 lux in both sides; and D) 100 lux in both sides. * indicates $p < 0.05$; $N = 10$.



Capítulo II

Enriched environment reduces the intensity and duration of PTZ-induced seizures in zebrafish

Sandro Daniel Córdova *1, Thainá Garbino dos Santos 1, Ben Hur Marins Mussulini 1, Suelen Baggio 1, Diogo Losch de Oliveira *1

1 Laboratory of Cellular Neurochemistry, Department of Biochemistry, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*** Address for correspondence:**

Sandro Daniel Córdova or Diogo Losch de Oliveira

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo.

Zip code: 90035-003

Porto Alegre, RS, BRAZIL

Phone: +55 51 33085555

Fax: +55 51 33085540

E-mail: sandrocordova@gmail.com or losch@ufrgs.br

Abstract

Epileptic seizures concern a set of disorders caused by excessive, abnormal and hypersynchronous electrical discharges in the brain. Epileptic seizures may lead to cognitive impairments when occurred during brain development. About one third of patients with epilepsy are refractory to antiepileptic drugs. Environmental enrichment has provided cognitive, sensorial and social stimuli with a potential use for preventing and treating injuries of central nervous system. In this context, the main goal of this study was to evaluate the effects of enriched environment on behavioral and seizure profile of zebrafish submitted to PTZ-induced seizures. Animals maintained for a week under environmental enrichment presented a less severe seizure pattern when compared to animals maintained in barren environment. Additionally, environmental enrichment reduced the time and the frequency that animals expressed scores IV (clonic seizure-like behavior) and V (fall to the bottom of the tank, tonic seizure-like behavior) of seizure induced by PTZ. The PTZ-induced seizure altered zebrafish locomotion in open tank test when tested 24h after the seizure induction. Anxiety-like behavior was not altered in zebrafish subjected to PTZ-induced seizure neither to exposition to enriched environment for a week when tested in black/white test 3 days after seizure induction. Social preference test also showed no statistical difference between groups when tested seven days after seizure induction.

Keywords: zebrafish, pentylenetetrazol, environmental enrichment, epilepsy.

Introduction

Epileptic seizures are induced by a wide range of factors including febrile episodes, head injuries, central nervous system infections, and genetic diseases [19]. They are usually triggered by an imbalance between cerebral excitatory and inhibitory neurotransmitter systems, which can lead to excessive, abnormal and hypersynchronous electrical discharges in the brain [10, 13]. According to World Health Organization, 2.4 million people are diagnosed with epilepsy and/or epileptic seizures each year and approximately 50 million people currently live with epilepsy worldwide.

In many cases, seizures are associated with cognitive impairments that can affect the normal life of the individual, reducing the life quality, generating depression, social stigma in addition to the stress of living with the possibility of unexpected seizures [1, 27]. The high incidence and the damage that may be caused by seizure increase the requirement to find treatments that could prevent crises and/or reduce the damage induced by them [14]. The treatment of epilepsy with antiepileptic drugs is effective for most patients, however, have no effect on recovering cognitive damages caused by seizures. Additionally, some antiepileptic drug can induces cognitive losses and alterations in behavioral functions [1]. A large portion of patients (approximately one-third) is refractory to available drug treatments [32], evidencing the importance of the development of alternative treatments for this disease [14].

Environmental enrichment consists in a strategy that provides sensorial, social and cognitive stimuli similar to those find in natural conditions, improving the

quality of life in addition to lead to several CNS benefits as increase the cognitive ability, the synaptic plasticity and hippocampal neurogenesis [2, 25]. Moreover, environmental enrichment has a wide potential preventing as well as threatening different injuries and diseases that affect the central nervous system [18, 25].

The use of environmental enrichment is known to induce encouraging benefits on rodents behavior in different tests [3, 15, 22, 36]. This intervention have a positive effect over several diseases increasing the cognition in rodents models of autism [12], hypoxia-ischemia [29], Alzheimer disease [9, 26] and epilepsy [11]. Enriched environment also provides benefit over psychiatric disorders as schizophrenia and anxiety-like behavior [4, 6, 16, 20, 28]. The use of environmental enrichment as a therapeutic tool for zebrafish is very recent and needs further studies to verify if it generates in this model, the same benefits observed in rodents. Initial studies provide encouraging results regarding the use of environmental enrichment for zebrafish model. A period of 7 days of exposure to an environmental enrichment containing gravel and artificial plants was able to increase the number of proliferative cells in telencephalon. Zebrafish presents lower anxiety-like behavior and increased locomotion levels when kept for a period of 4 weeks in an environmental enrichment comparing to control group animals (housed in a barren tank) in inhibitory avoidance learning test [21].

Taking into account the effectiveness of environmental enrichment in the treatment of central nervous system disorders, the objective of the present

study was evaluate the effects of enriched environment over behavior and over the seizure pattern induced by PTZ in zebrafish model.

Material and Methods

Reagents

Pentylentetrazole (PTZ) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). *Artemia* sp. was purchased from Artêmia Salina do RN (Brazil) and commercial flake food was purchased from Alcon (Brazil).

Animals

Forty-eight adult zebrafish (4 to 6 months-old, standard short-fin phenotype) from both sexes were used. Animals were purchased from a local aquarium supply store (Delphis, RS, Brazil) and kept under an automated recirculating system with mechanical, chemical and biological filtrations. System water was maintained at 28 ± 1 °C, pH of 7.0 ± 1 , and conductivity of 500 ± 50 μ S/cm. A 14/10 light/dark cycle (lights on at 7:00 am) was used and animals were feed 4 times a day: *Artemia* sp. at 9:00 a.m. and 5:00 p.m.; commercial flake food at 11:30 a.m. and 02:30 p.m. All experiments were conducted accordingly to the Canadian Guide to the Care and Use of Experimental Animals and were approved by Animal Ethic Committee from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (number 26568).

Enriched Environment Protocol

Enriched Environment protocol was based on previous works performed by Schroeder, et al. [33] and von Krogh, et al. [35]. Briefly, 15 L aquariums were filled with 10 L of system water with the same water quality parameters used for animal's housing. A gravel substrate (size 4-9 mm, filling 3 cm above the floor)

and two plastic plants (approximately 15 cm height) were added to the tanks. Barren aquariums with the same water volume were used as a non-enriched environment. Fish were randomly assigned between non-enriched and enriched environments and both groups were composed by animals of both sexes with similar weights and sizes. Animals were maintained on these environments for 7 days. After this period, all fish were randomly assigned into one of the 4 groups: non-enriched group treated with vehicle (barren environment - BE) or PTZ (BE-PTZ) and enriched group treated with vehicle (enriched environment - EE) or PTZ (EE-PTZ).

Seizure induction

Seizure induction protocol was based on previous work performed by Mussulini et al. [23]. Briefly, animals were removed from enriched or non-enriched environments and individually placed in a PTZ solution (10 mM) for 20 min. Control animals were exposed to system water only. Behavioral profile was video recorded and seizure scores were assigned accordingly to Mussulini, et al. [23] by two independent observers in a blinded fashion. After seizure induction, fish were removed from PTZ solution or system water and transferred to a beaker filled with system water for removing residual PTZ from animal body.

Behavioral tests

Animals were fed 1 hour before the beginning of the test and they were habituated with the experimental room for at least 1 hour in a 3 L tanks at a density of 2 animals/L under the illumination used during the test. System water,

with the same quality parameters described above, was used. For all tests, animals were randomly removed from their housing tank and individually introduced in the center of the apparatus. After the end of each test, fish were put in a new home tank to prevent their re-testing. Each experimental group corresponds to the sum of 3 different animal batches, which were tested in different experimental days. This procedure was performed to reduce the influence of the testing day on the animal response. All tests were performed between 9:00 am and 12:00 am. One day after the seizure induction, animals were tested in the open tank task, three days after seizure induction in the black/white task and seven days after seizure induction in the social preference task.

Open Tank Test

One day after seizure induction, animals were submitted to the open tank test. This apparatus consisted in a trapezoidal plastic tank (23.9 cm along the bottom x 28.9 cm at the top x 15.1 cm high and 15.9 cm along the diagonal side; it was 7.4 cm wide at the top, and tapered to 6.1 cm at the bottom) filled with 1.5 L of system water (Rosemberg, et al. [30]). A high definition USB camera was placed 40 cm from the testing tank to ensure that the apparatus was within the camera vision range and it was used to monitor the location and swimming activity of the fish. The animal's behavior was tracked by Any-maze software (Stoelting CO, USA). A yellow sheet of paper (80x60 cm) were placed 10 cm behind the tank to ensure a uniform background for the video analysis. In order to boost the contrast between the background and zebrafish, two 60-watts light bulbs were placed 30 cm above de apparatus. The trapezoidal tank was

virtually divided into three equally horizontal areas (bottom, middle, and top) in order to evaluate vertical exploratory activity. Once the animals were placed in the novel test tank, the recording was started. Each subject was observed individually in a single session and the behavior was recorded over a period of 6 min. The following parameters were measured: total distance travelled, mean speed, and time immobile.

Black/White Test

This test was performed 3 days after seizure induction. Black/white tank used was 30x15x10 cm (length x width x depth) as described by Cordova, et al. [7]. Both compartments were internally covered with contact paper (white/black) to avoid animal's reflection in the wall. Illumination in the center of each compartment was 70+5 lux (ceiling fluorescent lamps). Animals were individually introduced in the center of the apparatus and behavior was recorded during 6 min. Water column depth was 4 cm. The following endpoint parameters were analyzed: total time spent in each compartment and total number of midline crossings.

Social Preference Test

Seven days after seizure induction animals were submitted to the social preference test. It consists of a 50 cm x 15 cm x 10 cm (length x height x width) glass made aquarium divided into five 10 cm x 15 cm x 10 cm portions. The fish that was tested had free access to the three central portions which was divided from the side portions by a transparent glass. In one lateral, was put a conspecific while the other side was empty [17]. Test duration was equal to 6

min. The central area was virtually divided in three 10 cm compartments: center (neutral), target (close to the conspecific lateral side), and opposite (close to the empty lateral side). In order to avoid a putative influence of external stimuli the aquarium was turned 180 degrees after one animal of each group be tested. A high definition webcam connected to a computer was used to record and analyze animal's position and behavior through the Any-maze software (Stoeling CO, USA). The webcam was positioned in front of the apparatus. The following parameters were measured by endpoint behaviors: total distance travelled, entries in the target area, entries in the opposite area, time in the target area, and time in the opposite area.

Statistical Analysis

Seizure intensity was analyzed by unpaired t test and seizure frequency by Mann-Whitney. Open tank test, Social preference test and Black/White test data were analyzed by two-way ANOVA followed by the Tukey's post hoc test for unequal samples and expressed as mean + standard error. $p < 0,05$ was considered statistically different.

Results

PTZ-induced Seizures

Although enriched environment has not played a protective effect on the seizure intervals 0-150s (Fig 1A; $P=0.475$), 150-300s (Fig 1B; $P=0.769$), 300-900s (Fig 1C; $P=0.712$) and 900-1080s (Fig 1D; $P=0.063$), it was able to decrease the intensity of the seizures in the period between 1080 and 1200s (Fig 1E; $P=0.004$).

The enriched environment reduced the duration of seizures score IV (clonic seizure-like behavior $P<0.0001$) and V (fall to the bottom of the tank, tonic seizure-like behavior $P<0.0001$; Fig 2A and B). In the same way, the frequency of seizures scores IV ($P=0.004$) and V ($P<0.0001$) was reduced in animals exposed to enriched environment when compared to animals from BE (Fig 2C and D). The latency to seizure score IV was similar for both groups ($P=0.282$; Fig 2E).

Open Tank test

The total distance performed by animals from EE was higher when compared to BE+PTZ ($q=5,469$) and EE+PTZ ($q= 4,007$) animals. The total distance performed by EE did not differ from BE group ($q= 1,949$, Fig 3A). Animals from the EE group also presented a higher mean speed compared to BE+PTZ ($q= 5,457$) and EE+PTZ ($q= 3,990$) groups not differing from BE group ($q= 1,968$, Fig 3B). Although there was no statistical difference, animals subjected to PTZ-

induced seizures tended to spend more time immobile (Fig 3C). The BE+PTZ group performed a smaller distance in top zone only when compared to the BE group ($q= 4,118$, Fig. 4A). Groups did not differ in the number of entries and the time spent on top zone (Fig. 4B-C). Groups did not differ in the number of entries, the time spent, and distance performed on middle zone. Nonetheless, animals from BE+PTZ and EE+PTZ groups had a tendency to reduce the number of entries into this zone, whereas this tendency was higher in the BE+PTZ group (Fig. 4D-F). Animals from the BE+PTZ spent more time in this zone when compared to BE group ($q= 3,866$) but not comparing to EE ($q= 2,956$) and EE+PTZ ($q= 1,812$) groups. The distance performed in this area by EE group was higher when comparing to BE+PTZ ($q= 4,547$) group, not differing from the BE ($q= 2,706$) and the EE+PTZ ($q= 3,648$) groups (Fig. 4G-I).

Social Preference Test

The total distance travelled did not differ between groups (Fig. 5). The number of entries in the target zone and in the opposite zone were similar for every groups (Fig 6A and B). Time exploring the opposite and the target zones did not present difference among groups (Fig. 6C and D).

Black/White Test

The number of changes among white and black compartments was similar between all groups Fig. 7A. The same occurred for the percentage of time spent

into the white side Fig. 7B and the time spent in white compartment per entry Fig. 7C.

Discussion

The use of animals in research have been of great value in the development of new drugs and alternative treatments in various areas of knowledge. Over the years, the care of the health and welfare of animals has evolved significantly. One of the actions taken to improve the quality of life of animals is the use of enriched environments. In addition to improving the quality of life, environmental enrichment is able to benefit brain structures and functions in different animal models [24, 31]. In this study, we evaluate the effect of previous exposure to EE in zebrafish that were subsequently subjected to the PTZ seizure model.

The present work shows an encouraging effect of EE over the seizure induced by PTZ in zebrafish. Through the analysis of the seizure scores, we demonstrated that in animals submitted to the EE for a week the seizure is less severe in the last minutes of exposure to PTZ than for animals maintained in barren environment. Furthermore, although the time to reach the seizure score IV is equal for both groups, the time that animals from the group EE remains in scores IV and V is lower than the BE group. Another important benefit generated by EE was the decrease in frequency of seizure score IV and V. The use of EE for zebrafish model is very recent and few is known about the brain alterations induced by this intervention. Based in rodents results, the preventive effect showed by EE exposed animals in PTZ induced seizure, may be related to the brain alterations associated to it such as, neurogenesis, increase synapse plasticity and dendritic spine density [5, 18, 34].

In the open tank test, animals subjected to EE traveled a higher distance than BE+PTZ and EE+PTZ groups and presented a tendency to travel higher

distances than BE animals. Moreover, animals from BE submitted to PTZ induced seizure performed shorter distances in the top zone than control animals and in the bottom zone when compared to EE group. Taken together, these differences evidence an influence of EE over exploratory pattern in zebrafish.

In the social preference test animals from BE+PTZ group tended to spent more time in the opposite and less time in the target zones than BE animals. Enriched environment exposed animals, subjected or not to PTZ-induced seizures, have means of time in the opposite and target zones very similar to BE animals, suggesting that the influence of EE is greater than the seizure induction.

For the black/white test, the behavioural results were similar among all groups, showing that the anxiety-like behaviour was not altered by PTZ seizure induction neither by the exposure to EE. This result was expected once other works a did not find a relation between the seizure induction and alterations in anxiety-like behavior [8].

In our work, EE markedly reduced the seizure severity induced by PTZ, however the changes over zebrafish response in behavioral tests was less pronounced. Although behavioral alterations were discrete when compared to changes in seizure pattern, it does not mean that the EE does not lead to cognitive benefits in zebrafish. The use of different behavioral tests could reveal changes that have not been identified by the tests that we used. Performing the behavioral testing at different times after the seizure induction may also find differences that were not detected at the time that we assessed. In conclusion,

we showed that EE is a strategy that exhibits a great potential over PTZ seizure and that may be effective over other insults to central nervous system in zebrafish model.

References:

- [1] A.P. Aldenkamp, N. Bodde, Behaviour, cognition and epilepsy, *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum* 182 (2005) 19-25.
- [2] C. Bezzina, L. Verret, H. Halley, L. Dahan, C. Rampon, Environmental enrichment does not influence hypersynchronous network activity in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease, *Frontiers in aging neuroscience* 7 (2015) 178.
- [3] A.M. Birch, N.B. McGarry, A.M. Kelly, 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 (2013) 437-450.
- [4] J.C. Brenes, M. Lackinger, G.U. Hoglinger, G. Schratt, R.K. Schwarting, M. Wöhr, Differential effects of social and physical environmental enrichment on brain plasticity, cognition, and ultrasonic communication in rats, *J Comp Neurol* (2015).
- [5] E.L. Burrows, A.J. Hannan, Cognitive endophenotypes, gene-environment interactions and experience-dependent plasticity in animal models of schizophrenia, *Biological psychology* (2015).
- [6] E.L. Burrows, C.E. McOmish, L.S. Buret, M. Van den Buuse, A.J. Hannan, Environmental Enrichment Ameliorates Behavioral Impairments Modeling Schizophrenia in Mice Lacking Metabotropic Glutamate Receptor 5, *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 40 (2015) 1947-1956.
- [7] S.D. Cordova, T.G. Dos Santos, D.L. de Oliveira, Water column depth and light intensity modulate the zebrafish preference response in the black/white test, *Neurosci Lett* 619 (2016) 131-136.
- [8] S.D. Cordova, C.M. Loss, D.L. de Oliveira, Low-intensity physical training recovers object recognition memory impairment in rats after early-life induced Status epilepticus, *Int J Dev Neurosci* 31 (2013) 196-201.
- [9] D.A. Costa, J.R. Cracchiolo, A.D. Bachstetter, T.F. Hughes, K.R. Bales, S.M. Paul, R.F. Mervis, G.W. Arendash, H. Potter, Enrichment improves

cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms, *Neurobiol Aging* 28 (2007) 831-844.

[10] C. Elger, D. Schmidt, Modern management of epilepsy: a practical approach., *Epilepsy Behav* 12 (2008) 501-539.

[11] R.P. Fares, A. Belmeguenai, P.E. Sanchez, H.Y. Kouchi, J. Bodennec, A. Morales, B. Georges, C. Bonnet, S. Bouvard, R.S. Sloviter, L. Bezin, Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats, *PLoS One* 8 (2013) e53888.

[12] M.R. Favre, D. La Mendola, J. Meystre, D. Christodoulou, M.J. Cochrane, H. Markram, K. Markram, Predictable enriched environment prevents development of hyper-emotionality in the VPA rat model of autism, *Frontiers in neuroscience* 9 (2015) 127.

[13] R.S. Fisher, W. van Emde Boas, W. Blume, C. Elger, P. Genton, P. Lee, J. Engel, Jr., Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE), *Epilepsia* 46 (2005) 470-472.

[14] A. Griffin, C. Krasniak, S.C. Baraban, Advancing epilepsy treatment through personalized genetic zebrafish models, *Prog Brain Res* 226 (2016) 195-207.

[15] C. Grinan-Ferre, D. Perez-Caceres, S.M. Gutierrez-Zetina, A. Camins, V. Palomera-Avalos, D. Ortuno-Sahagun, M.T. Rodrigo, M. Pallas, Environmental Enrichment Improves Behavior, Cognition, and Brain Functional Markers in Young Senescence-Accelerated Prone Mice (SAMP8), *Molecular neurobiology* (2015).

[16] A.J. Grippo, E. Ihm, J. Wardwell, N. McNeal, M.A. Scotti, D.A. Moenk, D.L. Chandler, M.A. LaRocca, K. Preihs, The effects of environmental enrichment on depressive and anxiety-relevant behaviors in socially isolated prairie voles, *Psychosomatic medicine* 76 (2014) 277-284.

[17] L. Grossman, E. Utterback, A. Stewart, S. Gaikwad, K.M. Chung, C. Suci, K. Wong, M. Elegante, S. Elkhayat, J. Tan, T. Gilder, N. Wu, J. Dileo, J. Cachat, A.V. Kalueff, Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish, *Behav Brain Res* 214 (2010) 277-284.

- [18] A.J. Hannan, Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity, *Neuropathology and applied neurobiology* 40 (2014) 13-25.
- [19] W.A. Hauser, The prevalence and incidence of convulsive disorders in children, *Epilepsia* 35 Suppl 2 (1994) S1-6.
- [20] G. Laviola, A.J. Hannan, S. Macri, M. Solinas, M. Jaber, Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders, *Neurobiol Dis* 31 (2008) 159-168.
- [21] R. Manuel, M. Gorissen, M. Stokkermans, J. Zethof, L.O. Ebbesson, H. van de Vis, G. Flik, R. van den Bos, The effects of environmental enrichment and age-related differences on inhibitory avoidance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton), *Zebrafish* 12 (2015) 152-165.
- [22] P. Mesa-Gresa, A. Perez-Martinez, R. Redolat, Environmental Enrichment Improves Novel Object Recognition and Enhances Agonistic Behavior in Male Mice, *Aggressive behavior* (2013).
- [23] B.H. Mussulini, C.E. Leite, K.C. Zenki, L. Moro, S. Baggio, E.P. Rico, D.B. Rosemberg, R.D. Dias, T.M. Souza, M.E. Calcagnotto, M.M. Campos, A.M. Battastini, D.L. de Oliveira, Seizures induced by pentylenetetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization, *PLoS One* 8 (2013) e54515.
- [24] J. Nithianantharajah, A.J. Hannan, Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system, *Nat Rev Neurosci* 7 (2006) 697-709.
- [25] T.Y. Pang, A.J. Hannan, Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity, *Neuropharmacology* 64 (2013) 515-528.
- [26] L. Polito, A. Chierchia, M. Tunesi, I. Bouybayoune, P.G. Kehoe, D. Albani, G. Forloni, Environmental enrichment lessens cognitive decline in APP23 mice without affecting brain sirtuin expression, *J Alzheimers Dis* 42 (2014) 851-864.
- [27] R. Quintas, A. Raggi, A.M. Giovannetti, M. Pagani, C. Sabariego, A. Cieza, M. Leonardi, Psychosocial difficulties in people with epilepsy: a

systematic review of literature from 2005 until 2010, *Epilepsy Behav* 25 (2012) 60-67.

[28] D. Ragu Varman, K.E. Rajan, 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 (2015) e0127945.

[29] J.J. Rojas, B.F. Deniz, P.M. Miguel, R. Diaz, E. Hermel Edo, M. Achaval, C.A. Netto, L.O. Pereira, Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat, *Exp Neurol* 241 (2013) 25-33.

[30] D.B. Rosemberg, E.P. Rico, B.H. Mussulini, A.L. Piato, M.E. Calcagnotto, C.D. Bonan, R.D. Dias, R.E. Blaser, D.O. Souza, D.L. de Oliveira, 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 (2011) e19397.

[31] A. Sale, N. Berardi, L. Maffei, Enrich the environment to empower the brain, *Trends Neurosci* 32 (2009) 233-239.

[32] D. Schmidt, Drug treatment of epilepsy: options and limitations, *Epilepsy Behav* 15 (2009) 56-65.

[33] P. Schroeder, S. Jones, I.S. Young, L.U. Sneddon, What do zebrafish want? Impact of social grouping, dominance and gender on preference for enrichment, *Laboratory animals* 48 (2014) 328-337.

[34] F. Simao, J.A. Porto, M.L. Nunes, Effects of enriched environment in spatial learning and memory of immature rats submitted to early undernourish and seizures, *Int J Dev Neurosci* 30 (2012) 363-367.

[35] K. von Krogh, C. Sorensen, G.E. Nilsson, O. Overli, Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments, *Physiol Behav* 101 (2010) 32-39.

[36] M. Zerwas, S. Trouche, K. Richetin, T. Escude, H. Halley, R. Gerardy-Schahn, L. Verret, C. Rampon, Environmental enrichment rescues memory in mice deficient for the polysialyltransferase ST8SiaIV, *Brain structure & function* (2015).

Figure 1

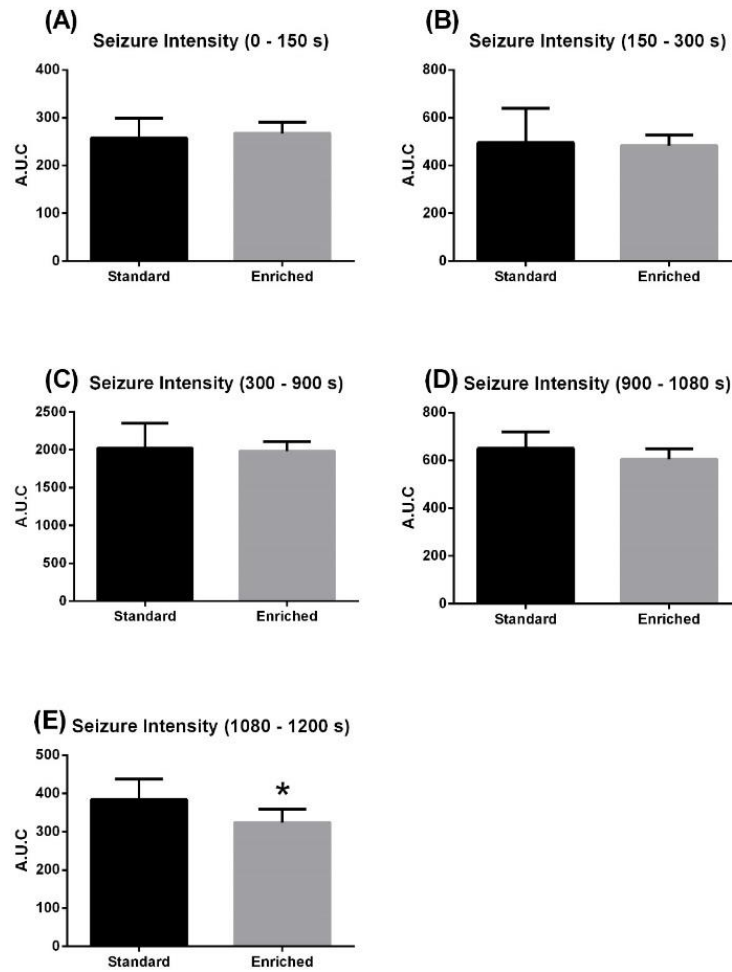


Figure 1

PTZ-induced seizure intensity in animals maintained in standard condition or environmental enrichment for 7 days. * indicates $p < 0.05$; $N = 9$.

Figure 2

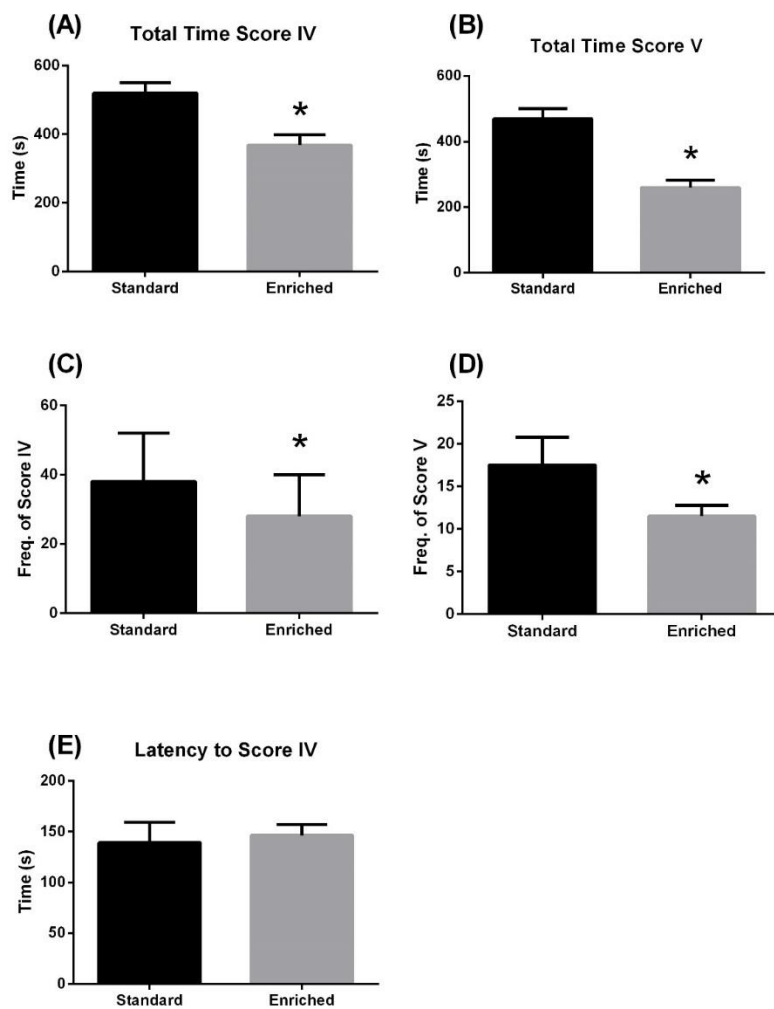


Figure 2

Time and frequency of manifestation of scores IV and V during PTZ-induced seizure in animals maintained in standard condition or environmental enrichment (7 days). * indicates $p < 0.05$; $N=9$.

Figure 3

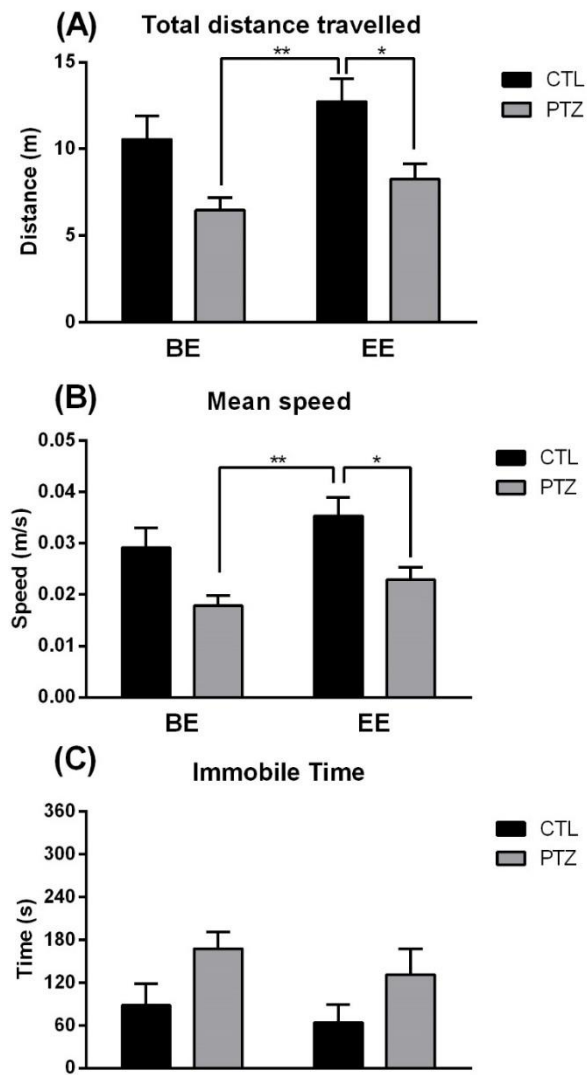


Figure 3

Endpoints of total distance travelled, mean speed and time immobile in open tank for animals subjected to PTZ-induced seizure, maintained in standard condition or environmental enrichment (7 days). * indicates $p < 0.05$; $N = 9$.

Figure 4

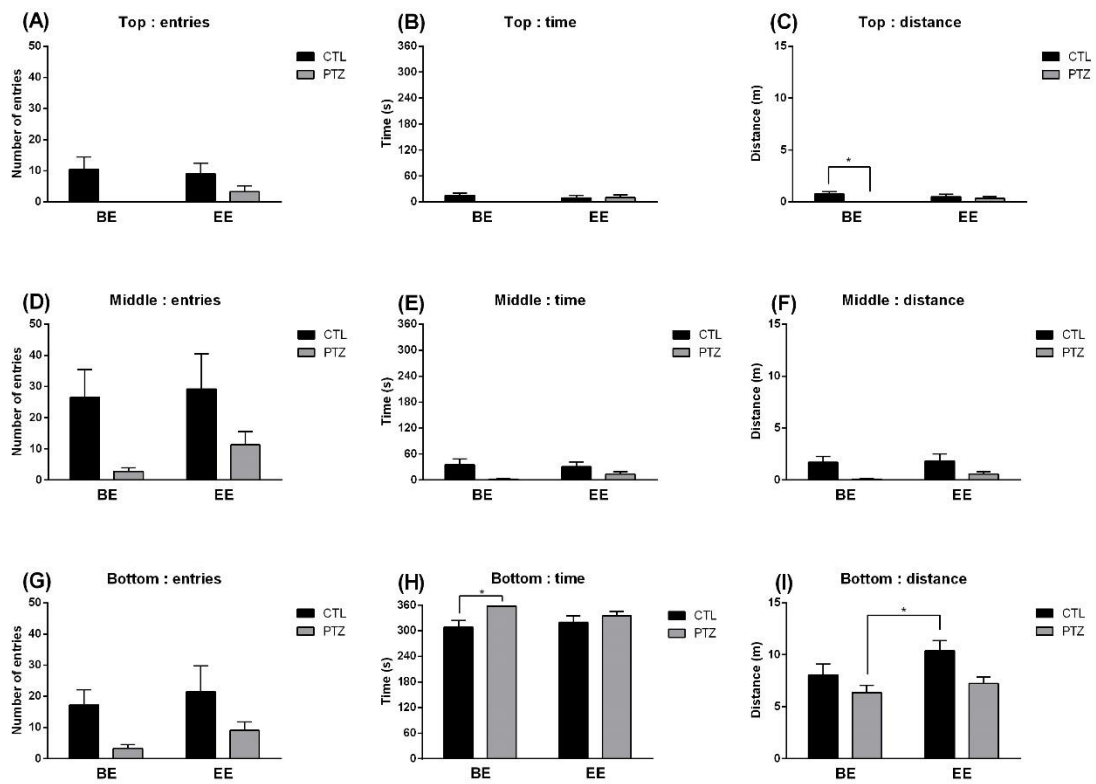


Figure 4

Effects of PTZ-induced seizure and environmental enrichment (7 days) over the number of entries, time spent and distance travelled in the bottom, middle and top zone of open tank. * indicates $p < 0.05$; $N = 9$.

Figure 5

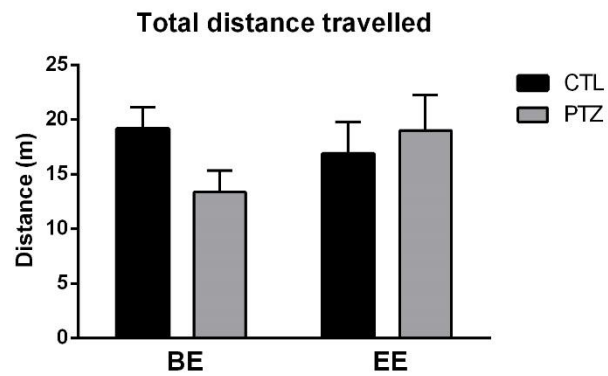


Figure 5

Distance performed by animals subjected to PTZ-induced seizure and maintained in standard condition or environmental enrichment (7 days) in social preference task. N=9.

Figure 6

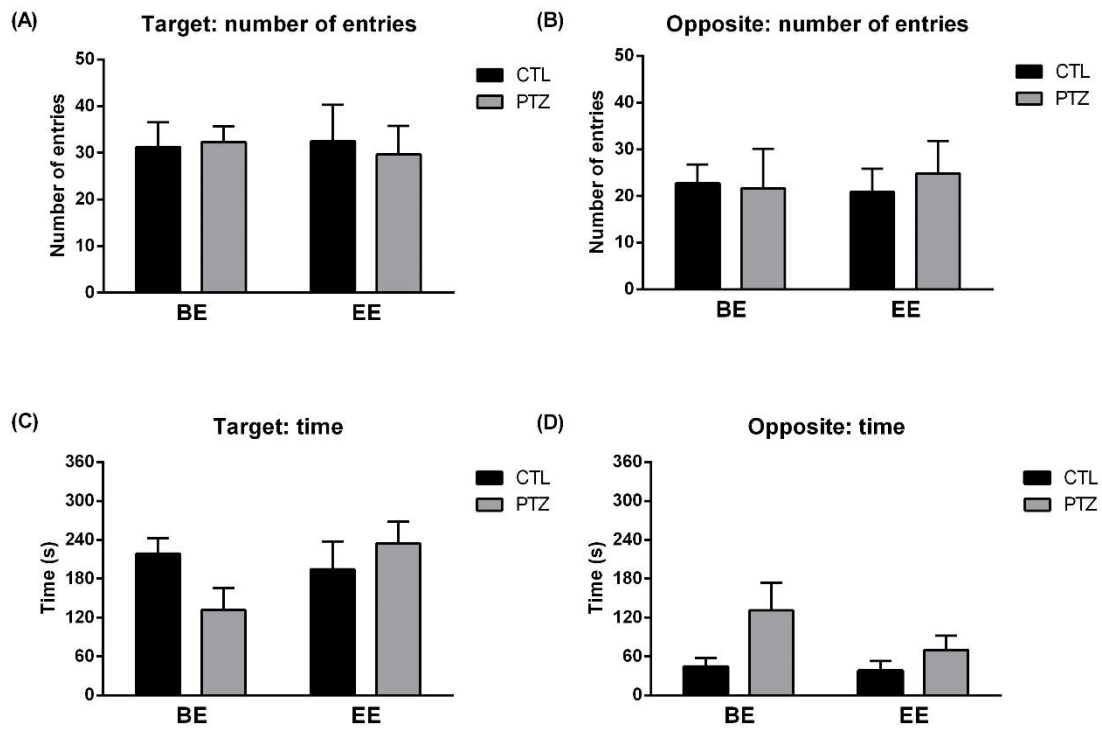


Figure 6

Number of entries and time spent in target and opposite sides of social preference tank by animals subjected to PTZ-induced seizure and maintained in standard condition or environmental enrichment (7 days). N=9.

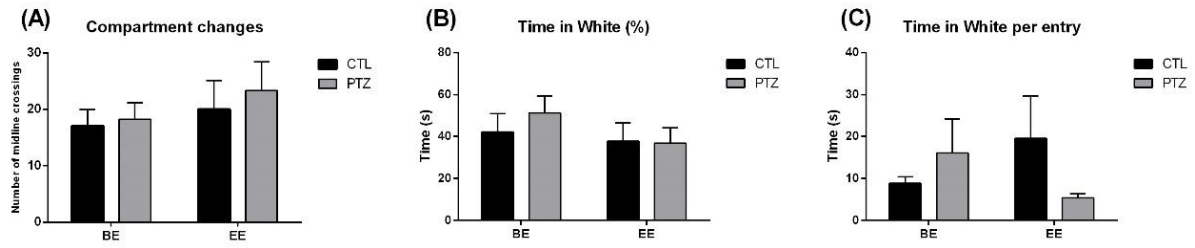


Figure 7

Total number of changes between compartments, time in the white compartment and time per entry in white compartment in animals subjected to PTZ-induced seizure and maintained in standard condition or environmental enrichment (7 days). N=9.

Figure 7

IV. Discussão

O interesse pela utilização do peixe zebra como modelo animal tem crescido de maneira significativa nos últimos anos nas mais diversas áreas do conhecimento. Este interesse se deve a um conjunto de fatores, que envolvem o baixo custo de criação e manutenção, possibilidade de trabalhar com animais modificados geneticamente e a testagem em larga escala de fármacos (KARI; RODECK; DICKER, 2007). Ao longo das últimas décadas, junto com o crescente número de trabalhos utilizando o peixe zebra, aumentou de forma significativa o número de testes comportamentais disponível para este modelo (AHMAD et al., 2012; BLASER et al., 2010; CACHAT et al., 2010; MATHUR; LAU; GUO, 2011; MAXIMINO; DE BRITO; et al., 2010; ROSEMBERG et al., 2011). No entanto, o padrão comportamental e as preferências/aversões do peixe zebra em situações padrão ainda necessitam ser investigados. Embora existam outros testes que visem avaliar a ansiedade em peixe zebra, o teste mais utilizado para medir os níveis de ansiedade é o teste de claro/escuro (BLASER et al., 2010; CHAMPAGNE et al., 2010; MAXIMINO; MARQUES DE BRITO; et al., 2010; SERRA et al., 1999; WANG et al., 2014). Este teste foi inicialmente proposto como adaptação do teste, com o mesmo nome, estabelecido para roedores (MAXIMINO; MARQUES DE BRITO; et al., 2010). A premissa desse teste é baseada no conflito que os animais vivenciam, quando expostos a um novo aparato, entre ficar em um ambiente considerado mais seguro, ou explorar o aparato como um todo. Em peixe zebra, o teste consiste em um aquário com um compartimento escuro (preto, coberto ou não) e um compartimento claro (branco ou transparente) e o tempo de permanência

em cada um dos compartimentos é registrado. Os dados observados na literatura não demonstram de maneira definitiva se o peixe zebra prefere permanecer no compartimento escuro ou no claro ou ainda, não apresenta preferência por nenhum dos lados (BLASER et al., 2010; CHAMPAGNE et al., 2010; MAXIMINO; DE BRITO; et al., 2010; SERRA et al., 1999). Estas diferenças podem estar relacionadas a diversos fatores, como: diferença na intensidade luminosa, manipulação dos animais, volume de água, etc. Para verificar possíveis fatores que estivessem influenciando na resposta do peixe zebra ao claro-escuro e que dificultassem ou impedissem a replicação dos resultados, decidimos investigar a influência da intensidade luminosa e da altura da coluna d'água sobre a preferência dos animais no teste de claro/escuro. Nossos resultados demonstraram que estes dois fatores influenciam fortemente o tempo de permanência do peixe zebra no compartimento escuro ou claro. Estes resultados foram de fundamental importância para a realização do capítulo II, uma vez que no segundo capítulo tínhamos como objetivo avaliar os efeitos da crise induzida por PTZ sobre o comportamento do peixe zebra, incluindo o comportamento tipo ansiedade.

Os primeiros resultados apresentados no capítulo I são referentes a influência da altura da coluna de água sobre a preferência e foram obtidos utilizando um aquário medindo 30 cm x 15 cm x 10 cm (comprimento x altura x largura) com metade do aquário sendo preto e a outra metade branco. A iluminação utilizada provinha das lâmpadas fixas no teto da sala. Esse experimento demonstrou que a utilização de uma altura de coluna de água igual a 8 cm não gera um conflito capaz de induzir diferença no tempo

despendido em cada compartimento. Utilizando as mesmas configurações, apenas diminuindo a coluna de água para 4 cm, os animais passaram a permanecer mais tempo no compartimento preto. O maior tempo gasto no compartimento preto pode indicar uma preferência pelo compartimento preto ou mesmo uma aversão ao compartimento branco. É plausível, que este resultado esteja relacionado com a preferência do peixe zebra em nadar afastado da superfície. Segundo BLASER; GOLDSTEINHOLM (2012), o peixe zebra passa mais tempo em um compartimento profundo do que em um compartimento raso de um aquário quando é oferecido aos animais a possibilidade de optar por nadar em maiores profundidades. Na natureza, este comportamento é importante para evitar o ataque de predadores aéreos, enquanto em laboratório, sempre que os animais necessitam ser manipulados, a captura é realizada por redes que são introduzidas no aquário de cima para baixo, também estimulando este comportamento (AHMED; SEGUIN; GERLAI, 2011). Nossos primeiros resultados também sugerem que, para o compartimento branco ser utilizado como o estímulo aversivo do teste, é condicionante a utilização de uma coluna de água reduzida. Essa hipótese é plausível pelo fato de que os animais passaram menos tempo no compartimento branco somente quando a altura do nível de água foi ajustada para 4 cm (e não quando a coluna foi de 8 cm de altura). O trabalho de FRISCH; ANDERSON (2000), utilizando outra espécie de peixe (truta coral) demonstrou que os níveis de cortisol, lactato, glicose, hemoglobina e hematócrito circulantes são alterados quando os animais são expostos a um baixo volume de água. Visto que o cortisol é um hormônio envolvido diretamente na geração de comportamentos

tipo ansiedade, as alterações induzidas pela baixa coluna de água podem estar relacionadas ao aumento dos níveis circulantes de cortisol.

Utilizando um gradiente de profundidade gerado por um piso inclinado, reforçamos novamente a relevância da altura da coluna de água sobre a preferência do peixe zebra. Este parâmetro foi avaliado utilizando duas configurações: em uma o chão inclinado proporcionava uma profundidade de 4 cm do lado profundo e 2 cm do lado raso e na outra 8 cm do lado profundo e 4 cm do lado raso. Com este experimento, evidenciamos a influência do gradiente de profundidade, sendo que os animais passam mais tempo no compartimento profundo quando este possui as paredes pretas. Quando o lado branco foi configurado para ser o mais profundo os animais passaram tempos similares em cada um dos compartimentos, além de realizar um maior número de trocas entre os compartimentos. Este dado nos permite hipotetizar que os animais enfrentam um dilema no qual precisam optar: permanecer no lado escuro (escototaxia) ou permanecer no lado que possui a maior coluna de água. Para observar exclusivamente o efeito gerado pelo plano inclinado, os animais foram expostos em um aquário transparente (nas duas configurações de altura do nível de água), excluindo o contexto gerado pela utilização de um compartimento preto e outro branco. No aquário transparente, os animais despenderam uma maior parte do tempo total do teste no compartimento profundo, reforçando os dados que indicam que a altura da coluna da água é determinante na preferência do peixe zebra. Somados ao resultado do experimento anterior, em que os animais apresentam preferência pelo lado escuro somente na profundidade de 4 cm, os dados obtidos neste experimento

reforçam a noção de que o compartimento branco somente se constitui em um estímulo aversivo quando somado a um estímulo aversivo adicional (baixa coluna d'água), passando então a gerar uma resposta indicativa de medo/ansiedade em peixe zebra.

Outro importante resultado que obtivemos no entendimento dos parâmetros que podem estar gerando dados conflitantes da literatura e que, possivelmente, não permitem a replicabilidade dos resultados em alguns casos, está relacionado a influência da iluminação sobre a preferência do peixe zebra entre um compartimento claro e outro escuro. Para este experimento foi utilizada unicamente a profundidade de 4 cm de água, em um aquário com as mesmas configurações do aquário utilizado no primeiro experimento e com diferentes configurações luminosas.

Inicialmente, supúnhamos que os animais apresentariam uma clara preferência pelo compartimento preto, imaginando que, na natureza, ambientes menos iluminados dificultam a ação de predadores. Apesar disso, quando expostos a condição luminosa de 200 lux em ambos os compartimentos, os animais passaram tempos similares em cada um dos compartimentos. Da mesma forma, quando a intensidade luminosa foi ajustada para 100 lux em um compartimento e 200 lux no outro (tanto quando o lado claro era o branco quanto quando o lado claro era o preto), os animais não apresentaram preferência por nenhum dos lados do aquário. Baseados na nossa hipótese inicial, o resultado mais surpreendente foi obtido quando os animais foram expostos a uma iluminação constante de 100 lux no centro de cada um dos compartimentos. Nesta condição, os animais permaneceram mais tempo no

compartimento branco do que no preto invertendo a preferência observada no primeiro experimento que realizamos. Este resultado é intrigante pelo fato de que quando os animais foram expostos no mesmo aquário e com a mesma altura de coluna de água (4 cm) os animais passaram mais tempo no compartimento preto, sendo que a única variável foi a diferença de 30 lux (no primeiro experimento a iluminação utilizada foi a da sala que proporciona 70 lux no centro de cada compartimento). Até o presente momento, este é o primeiro trabalho que demonstra que uma pequena variação na intensidade luminosa é capaz de inverter a preferência do peixe zebra entre um compartimento branco e outro preto. Em um trabalho investigando a preferência do peixe zebra por ambientes mais ou menos iluminados, BLASER; PENALOSA (2011) também observaram alteração na preferência do peixe zebra, mas com diferenças de luminosidade muito maiores entre um compartimento e o outro do que as utilizadas no nosso teste. Já foi demonstrado que o peixe zebra possui uma densidade de fotorreceptores aumentada quando comparada com a densidade observada em seres humanos ou mesmo com outros modelos animais (NAWROCKI et al., 1985). Esta evidência suporta a hipótese de que a sua capacidade de identificar pequenas variações na intensidade luminosa possa estar gerando as diferenças observadas na preferência pelo compartimento branco e preto, no mesmo aquário, com a mesma profundidade de água (4cm) e com a única variável sendo a intensidade luminosa.

No capítulo II verificamos a influência do EA em animais que foram posteriormente submetidos ao modelo de crises induzidas por PTZ. A padronização do teste de claro/escuro realizada no Capítulo I foi fundamental

para a execução do Capítulo II, possibilitando a investigação da resposta de ansiedade do peixe zebra submetido as intervenções realizadas. A utilização de animais de laboratório tem um papel fundamental no desenvolvimento de novos fármacos e de tratamentos alternativos para as mais variadas áreas do conhecimento. O peixe zebra apresentou um crescente interesse nos últimos anos nas mais diversas áreas, por permitir a testagem em larga escala, sem a necessidade de grandes quantidades de fármacos e requerendo um menor espaço para manutenção quando comparado com modelos de roedores. Assim como a utilização do peixe zebra, a preocupação com o bem-estar animal e com a sua qualidade de vida, tem aumentado consideravelmente ao longo dos últimos anos. Estes cuidados, que garantem uma melhora na qualidade de vida dos animais, também aumentam a relevância dos resultados obtido na pesquisa, uma vez que animais sadios física e psicologicamente, garantem resultados mais fidedignos quanto ao objeto de estudo (modelos de doenças estudado e efeitos do tratamento), apresentando uma menor influência de agentes interferentes. Uma importante ferramenta que vem sendo utilizada para garantir uma melhor qualidade de vida dos animais é a intervenção com EA. A utilização do EA permite aos animais o desenvolvimento de um repertório comportamental maior, possibilitando comportamentos mais próximos daqueles observados na natureza. Em peixe zebra, o enriquecimento é geralmente gerado utilizando pedras de rio para forrar o fundo do aquário e plantas ornamentais sintéticas que imitam a vegetação observada na natureza (SCHROEDER et al., 2014; SPENCE et al., 2011; VON KROGH et al., 2010). Estes ornamentos permitem que os animais se escondam, depositem os ovos sobre as folhas da vegetação e procurem por alimento entre as pedras e as

folhas das plantas. Já foi demonstrado que o peixe zebra prefere ambientes com maior complexidade, contendo plantas e pedras no fundo, do que aquários sem estímulos (SCHROEDER et al., 2014), indicando que o EA utilizado para este modelo pode aumentar o bem-estar dos animais. Esta estratégia, além de melhorar a qualidade de vida dos animais, tem se mostrado capaz de beneficiar as estruturas e funções cerebrais em diferentes modelos animais com ou sem a indução de modelos que gerem danos (ILIN; RICHTER-LEVIN, 2009; NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; PEREIRA et al., 2007; SALE et al., 2009).

A avaliação do padrão de crises dos animais apresentou resultados encorajadores para a utilização do EA quando comparado aos animais mantidos em aquários padrão (sem estímulos). No primeiro resultado observado, apesar de o tempo necessário para atingir os estágios IV e V da crise não diferir entre os dois grupos, os animais mantidos em EA por uma semana passaram menos tempo nestes estágios. Esta prevenção foi também observada na frequência das crises estágios IV e V, os animais do grupo EA apresentaram um número menor de ocorrências destes estágios quando comparado com os animais do grupo controle. Pelo fato de poucos estudos terem sido realizados com foco no EA para peixe zebra, os mecanismos envolvidos nos resultados observados durante as crises induzidas por PTZ não estão bem estabelecidos. No entanto, os resultados obtidos em outros modelos animais submetidos ao EA, permitem levantar a hipótese de que a neurogênese, o aumento da plasticidade sináptica e da densidade sináptica podem estar relacionados com os benefícios observados (BURROWS;

HANNAN, 2015; HANNAN, 2014; SIMAO et al., 2012). A prevenção observada na crise induzida por PTZ, gerada pela exposição ao EA, fornece um importante estímulo para a utilização de estratégias que gerem alterações na anatomia e na fisiologia cerebral em humanos. É sabido que os períodos mais críticos para o desenvolvimento de crises epiléticas e de epilepsia são durante os primeiros anos de vida, diminuindo durante a adolescência e a fase adulta e voltando a aumentar após a sexta década de vida (SIDENVALL, R et al., 1993; STEPHEN; BRODIE, 2000). Baseados nos primeiros resultados do segundo capítulo, sugerimos que fatores que levem a alterações cerebrais semelhantes às observadas em animais exposto ao EA (aumento da neurogênese, do tamanho das sinapses, do número de conexões sinápticas e dos níveis de fatores tróficos no SNC) podem auxiliar na prevenção do surgimento das crises epiléticas.

No intuito de verificar se o modelo de crises induzidas por PTZ e a manutenção do aquário com EA induzem alterações no perfil exploratório do peixe zebra, realizamos o teste de open tank. Neste teste, os animais do grupo EA percorreram uma distância total maior do que os animais do grupo controle que foram submetidos ao modelo de crises induzidas por PTZ e do que os animais do grupo EA com crises induzidas por PTZ. Além disso, a distância percorrida pelos animais do grupo EA teve uma tendência de ser maior do que a percorrida pelo grupo controle. Estes resultados indicam que a intervenção com o EA eleva os níveis de locomoção do peixe zebra e que a crise induzida por PTZ reverte este aumento. Os animais do grupo padrão com crises induzidas por PTZ percorreram menores distâncias no topo e permaneceram

mais tempo no fundo do aquário do que os animais do grupo controle. A intervenção com EA foi capaz de prevenir estas alterações, uma vez que o animais do grupo EA com crises induzidas por PTZ não apresentaram diferenças nestes parâmetros quando comparados com o grupo controle. Além disso, os animais controle com crises induzidas por PTZ percorrerem menores distâncias no fundo do aquário quando comparados aos animais do grupo AE. Nossos resultados demonstraram que o EA influencia o padrão exploratório do peixe zebra quando testado no open tank, levando a um aumento da locomoção. Além disso, a crise induzida por PTZ diminui a distância percorrida no topo do aquário em animais controle, sendo que o EA se mostrou efetivo em prevenir esta diminuição. A diminuição da locomoção para os animais controle após a exposição ao PTZ era esperada, uma vez que este parâmetro já se mostrou alterado em trabalhos prévios (WONG et al., 2010). Embora não esteja claro o mecanismo que leva os animais do grupo EA a percorrer maiores distâncias, fatores como aumento do interesse por explorar ambientes novos, alterações nos níveis de estresse e diminuição da inibição podem ser determinantes nesta resposta (CHAPILLON et al., 1999; MAXIMINO; MARQUES DE BRITO; et al., 2010; ROY et al., 2001; VON KROGH et al., 2010).

O peixe zebra é uma espécie que vive em cardume e sempre que possível, tende a permanecer mais tempo próximo a outros animais da sua espécie. Esse comportamento assegura algumas vantagens que auxiliam na manutenção da vida do indivíduo e da espécie. Entre estas vantagens podemos citar a diminuição do risco de ataques de predadores, o fácil acesso a

parceiros para reprodução, e a troca de informações entre os indivíduos do grupo. Desta forma, animais que apresentem alterações no comportamento de interação social podem ter sua sobrevivência comprometida. Para verificar a capacidade de interação dos animais com crises induzidas por PTZ, em nosso trabalho realizamos o teste de preferência social. Neste teste são colocados dois aquários, em laterais opostas ao aquário em que o animal será testado. Os dois aquários laterais são preenchidos com o mesmo nível de água que o aquário de teste. Em um dos aquários não é colocado qualquer estímulo, enquanto no aquário oposto é colocado um animal com o peso e tamanho aproximado do animal a ser testado. Em condições normais os animais tendem a permanecer um tempo significativamente maior próximo ao aquário que contém o animal que serve como estímulo para interação, quase não explorando o lado oposto (contendo o aquário vazio). Neste teste, não foram observadas alterações estatisticamente significativas no tempo de interação com o animal co-específico. Apesar disso, os animais do grupo que sofreu a com crises induzidas por PTZ apresentaram uma tendência a permanecer mais tempo no lado oposto do co-específico, indicando que a interação social dos animais deste grupo pode estar alterada, embora o teste utilizado não tenha apresentado sensibilidade suficiente para detectar. Devido ao fato de os estudos comportamentais com o peixe zebra serem bastante recentes quando comparado com os estudos envolvendo roedores, ainda não existe uma grande variedade de testes, capazes de avaliar de diferentes formas e com níveis de sensibilidades diferentes. A criação de novos testes, que tenham como foco o estudo da interação social do peixe zebra podem

identificar diferenças na interação social que não foram detectadas no presente teste.

No intuito de investigar uma possível alteração nos níveis de ansiedade decorrente da indução de crises epiléticas, utilizamos o teste de claro/escuro. Para este trabalho, foram utilizados os parâmetros que consideramos os mais favoráveis e de fácil reprodução em diferentes laboratórios. Estes parâmetros foram utilizados com base no capítulo I da presente tese, que teve como objetivo aumentar a robustez do teste de claro/escuro. A altura da coluna d'água foi ajustada para 4 cm, com iluminação proveniente do teto da sala (70 lux) em um aquário de 30 cm x 10 cm x 15 cm (comprimento x largura x profundidade) sendo constituído por uma metade branca e a outra preta. O tratamento com PTZ não interferiu no tempo de permanência nem no número de entradas no compartimento branco dos animais. Uma vez que a crise induzida por PTZ leva a um aumento dos níveis de cortisol (WONG et al., 2010), e esta alteração está diretamente relacionado com um aumento do comportamento tipo ansiedade, esperávamos observar alterações neste parâmetro. Assim como a crise induzida por PTZ, a exposição ao EA não induziu alterações nos níveis de ansiedade apresentados pelos animais medidos no teste de claro escuro. Este dado está de acordo com o que esperávamos, uma vez que já foi demonstrado que o EA não leva a alteração nos níveis de ansiedade de animais que não sofreram outras intervenções (COLLYMORE; TOLWANI; RASMUSSEN, 2015).

Nesta tese demonstramos que a alteração no nível da coluna de água do aquário e da intensidade luminosa podem explicar, ao menos em parte, as

diferenças na resposta do peixe zebra no teste de claro/escuro observadas na literatura. Baseados em nossos resultados, propomos que o teste de claro/escuro seja realizado com uma coluna de água igual a 4 cm, com um compartimento branco e um escuro e com iluminação de 70 lux no centro de cada compartimento. A manutenção do peixe zebra por 7 dias em EA gera benefícios que amenizam a intensidade da crise induzida por PTZ. O comportamento do peixe zebra não foi alterado de maneira determinante pela crise induzida por PTZ nos testes comportamentais utilizados na presente tese. Uma vez que animais expostos a uma bateria de testes comportamentais apresentam respostas diferentes dependendo da ordem em que cada teste é realizado (ARENDASH; KING, 2002; LAD et al., 2010), em futuros trabalhos, uma sequência diferente de exposição aos testes ou mesmo a exposição a um único teste poderiam apresentar resultados distintos dos observados nesta tese.

V. CONCLUSÕES

Os resultados da presente tese permitem concluir que:

1. Quando expostos a um aquário contendo um compartimento preto e um compartimento branco, os animais apresentam preferência pelo lado preto somente diante de colunas de água reduzidas, passando tempo similar em cada um dos compartimentos quando a coluna de água é igual a 8 cm de altura.
2. A utilização de um plano inclinado no fundo do aquário influencia de forma determinante na resposta comportamental do peixe zebra. Os animais passam mais tempo no lado profundo quando este é configurado para ser o lado preto do aquário e também no aquário transparente. Quando o lado branco foi configurado para ser o lado profundo, os animais passaram um tempo similar em cada um dos compartimentos.
3. A utilização de um plano inclinado se mostrou determinante na resposta do peixe zebra tanto com uma diferença de 4 cm (lado profundo) e 2 cm (lado raso), quanto quando foi utilizada uma diferença de 8 cm (lado profundo) e 4 cm (lado raso).
4. A intensidade luminosa utilizada para a realização do teste de claro/escuro é determinante na resposta do peixe zebra. Quando testados em uma iluminação constante de 70 lux sobre o aquário (4 cm de coluna de água), os animais passaram mais tempo no compartimento preto. Quando testados com 200 lux no centro de cada um dos compartimentos ou com 100 lux no centro de um lado e 200 lux no

centro do outro, os animais não apresentaram preferência por nenhum dos compartimentos. Quando testados sob iluminação constante de 100 lux no centro de cada um dos compartimentos, os animais preferem permanecer no compartimento branco.

5. A manutenção do peixe zebra por uma semana em um aquário com EA gera uma proteção sobre a intensidade da crise epiléptica induzida por PTZ.
6. O EA induz alteração no padrão exploratório do peixe zebra e previne alterações induzidas no padrão locomotor de peixes que sofreram crises induzidas por PTZ.
7. A crise pelo modelo de PTZ tende a gerar alterações na interação social do peixe zebra e a exposição ao EA previne esta alteração.
8. Os níveis de ansiedade do peixe zebra não são alterados pela crise induzida por PTZ.
9. A exposição ao EA não leva a alteração no comportamento tipo ansiedade do peixe zebra.
10. A alteração no nível da coluna de água do aquário e da intensidade luminosa geram alterações na resposta do peixe zebra no teste de branco/preto. Um protocolo de EA com duração de 7 dias gera benefícios que amenizam a intensidade da crise induzida por PTZ em peixe zebra, seu efeito sobre a resposta comportamental necessita de mais investigações.

VI. PERSPECTIVAS

A presente tese apresenta resultados promissores do EA sobre a crise induzida por PTZ deixando como perspectivas para a continuação deste estudo:

1. Avaliar a neurogênese e a integração dos novos neurônios à rede neural após a exposição dos animais ao EA.
2. Verificar a influência do EA sobre a morte neuronal induzida pelo modelo de crise induzida por PTZ.
3. Avaliar a resposta comportamental do peixe zebra em períodos maiores após a indução da crise induzida por PTZ.
4. Verificar se a proteção induzida pelo EA persiste mesmo após a indução de mais de uma crise induzida por PTZ.
5. Avaliar a memória dos animais submetidos a crises induzidas por PTZ após a exposição por uma semana em EA.
6. Avaliar os efeitos da exposição ao EA em períodos iniciais do desenvolvimento em animais que serão submetidos ao modelo de PTZ na idade adulta.
7. Avaliar possíveis alterações nos níveis de fatores tróficos no SNC de peixes expostos ao EA.
8. Avaliar os níveis de cortisol dos peixes submetidos a crises induzidas por PTZ, com e sem a influência do EA.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS KF; LEITZMANN MF; BALLARD-BARBASH R; ALBANES D; HARRIS TB; HOLLENBECK A; KIPNIS V. Body mass and weight change in adults in relation to mortality risk. **Am J Epidemiol**, v. 179, n. 2, p. 135-44, Jan 15 2014.

AHMAD F; NOLDUS LPJJ; TEGELENBOSCH RAJ; RICHARDSON MK. Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. **Behaviour**, v. 149, n. 10-12, p. 1241-1281, 2012.

AHMED O; SEGUIN D; GERLAI R. An automated predator avoidance task in zebrafish. **Behav Brain Res**, v. 216, n. 1, p. 166-71, Jan 1 2011.

AK PD; ATAKLI D; YUKSEL B; GUEVELI BT; SARI H. Stigmatization and social impacts of epilepsy in Turkey. **Epilepsy & Behavior**, v. 50, p. 50-54, 9// 2015.

ARENDASH GW; KING DL. Intra- and intertask relationships in a behavioral test battery given to Tg2576 transgenic mice and controls. **Physiol Behav**, v. 75, n. 5, p. 643-52, Apr 15 2002.

ARIDA R; SCORZA F; DOS SANTOS N; PERES C; CAVALHEIRO E. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy Res**, v. 37, n. 1, p. 45-52, Oct 1999.

ARIDA RM; DE ALMEIDA A-CG; CAVALHEIRO EA; SCORZA FA. Experimental and clinical findings from physical exercise as complementary therapy for epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 26, n. 3, p. 273-278, 3// 2013.

ARRANT AE; SCHRAMM-SAPYTA NL; KUHN CM. Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 119-127, 11/1/ 2013.

ARROYO S; ANHUT H; KUGLER AR; LEE CM; KNAPP LE; GAROFALO EA; MESSMER S; PREGABALIN -011 INTERNATIONAL STUDY G. Pregabalin add-on treatment: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-response study in adults with partial seizures. **Epilepsia**, v. 45, n. 1, p. 20-7, Jan 2004.

ARZIMANOGLU A. Treatment options in pediatric epilepsy syndromes. **Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape**, v. 4, n. 3, p. 217-225, 2002/09// 2002.

AUVERGNE R; LERE C; EL BAHH B; ARTHAUD S; LESPINET V; ROUGIER A; LE GAL LA SALLE G. Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment. **Brain Res**, v. 954, n. 2, p. 277-85, Nov 8 2002.

BARBA-ESCOBEDO PA; GOULD GG. Visual social preferences of lone zebrafish in a novel environment: strain and anxiolytic effects. **Genes Brain Behav**, v. 11, n. 3, p. 366-73, Apr 2012.

BARBAZUK WB; KORF I; KADAVI C; HEYEN J; TATE S; WUN E; BEDELL JA; MCPHERSON JD; JOHNSON SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Res**, v. 10, n. 9, p. 1351-8, Sep 2000.

BAULAC M; DE BOER H; ELGER C; GLYNN M; KALVIAINEN R; LITTLE A; MIFSUD J; PERUCCA E; PITKANEN A; RYVLIN P. Epilepsy priorities in Europe: A report of the ILAE-IBE Epilepsy Advocacy Europe Task Force. **Epilepsia**, v. 56, n. 11, p. 1687-95, Nov 2015.

BECHARA RG; KELLY ÁM. Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats. **Behavioural Brain Research**, v. 245, p. 96-100, 5/15/ 2013.

BELCASTRO V; STRIANO P; GORGONE G; COSTA C; CIAMPA C; CACCAMO D; PISANI LR; OTERI G; MARCIANI MG; AGUGLIA U; STRIANO S; IENTILE R; CALABRESI P; PISANI F. Hyperhomocysteinemia in epileptic patients on new antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 51, n. 2, p. 274-9, Feb 2010.

BEN-MENACHEM E; AXELSEN M; JOHANSON EH; STAGGE A; SMITH U. Predictors of weight loss in adults with topiramate-treated epilepsy. **Obes Res**, v. 11, n. 4, p. 556-62, Apr 2003.

BENCAN Z; SLEDGE D; LEVIN ED. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 94, n. 1, p. 75-80, Nov 2009.

BENNETT EL; DIAMOND MC; KRECH D; ROSENZWEIG MR. Chemical and anatomical plasticity of brain. 1964. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 8, n. 4, p. 459-70, Fall 1996.

BERG AT. Postsurgical treatment of epilepsy. **Epilepsy Curr**, v. 4, n. 4, p. 127-30, Jul-Aug 2004.

_____. Risk of recurrence after a first unprovoked seizure. **Epilepsia**, v. 49 Suppl 1, p. 13-8, 2008.

BERG AT; SHINNAR S; LEVY SR; TESTA FM. Newly diagnosed epilepsy in children: presentation at diagnosis. **Epilepsia**, v. 40, n. 4, p. 445-52, Apr 1999.

BERGEN DC. Results of epilepsy surgery: still so much to learn. **Epilepsy Curr**, v. 6, n. 3, p. 80-2, May-Jun 2006.

BERKOVIC SF; KNOWLTON RC; LEROY RF; SCHIEMANN J; FALTER U; LEVETIRACETAM NSG. Placebo-controlled study of levetiracetam in idiopathic generalized epilepsy. **Neurology**, v. 69, n. 18, p. 1751-60, Oct 30 2007.

BIRCH AM; MCGARRY NB; KELLY AM. 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**, v. 23, n. 6, p. 437-50, Jun 2013.

BITON V. Effect of antiepileptic drugs on bodyweight: overview and clinical implications for the treatment of epilepsy. **CNS Drugs**, v. 17, n. 11, p. 781-91, 2003.

BLASER RE; CHADWICK L; MCGINNIS GC. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav Brain Res**, v. 208, n. 1, p. 56-62, Mar 17 2010.

BLASER RE; GOLDSTEINHOLM K. Depth preference in zebrafish, *Danio rerio*: control by surface and substrate cues. **Animal Behavior**, v. 83, n. Issue 4, p. 953–959, 2012.

BLASER RE; PENALOSA YM. Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test. **Physiol Behav**, v. 104, n. 5, p. 831-7, Oct 24 2011.

BLASER RE; ROSEMBERG DB. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36931, 2012.

BLOOMSMITH MA; BRENT LY; SCHAPIRO SJ. Guidelines for developing and managing an environmental enrichment program for nonhuman primates. **Lab Anim Sci**, v. 41, n. 4, p. 372-7, Aug 1991.

BURROWS EL; HANNAN AJ. Cognitive endophenotypes, gene-environment interactions and experience-dependent plasticity in animal models of schizophrenia. **Biol Psychol**, Dec 10 2015.

CACHAT J; STEWART A; GROSSMAN L; GAIKWAD S; KADRI F; CHUNG KM; WU N; WONG K; ROY S; SUCIU C; GOODSPEED J; ELEGANTE M; BARTELS B; ELKHAYAT S; TIEN D; TAN J; DENMARK A; GILDER T; KYZAR E; DILEO J; FRANK K; CHANG K; UTTERBACK E; HART P; KALUEFF AV. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nat Protoc**, v. 5, n. 11, p. 1786-99, Nov 2010.

CERVENKA MC; KOSSOFF EH. Dietary treatment of intractable epilepsy. **Continuum (Minneapolis)**, v. 19, n. 3 Epilepsy, p. 756-66, Jun 2013.

CHAMPAGNE DL; HOEFNAGELS CC; DE KLOET RE; RICHARDSON MK. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. **Behav Brain Res**, v. 214, n. 2, p. 332-42, Dec 25 2010.

CHAPILLON P; MANNECHE C; BELZUNG C; CASTON J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. **Behav Genet**, v. 29, n. 1, p. 41-6, Jan 1999.

CHEN J; CAI F; CAO J; ZHANG X; LI S. Long-term antiepileptic drug administration during early life inhibits hippocampal neurogenesis in the developing brain. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 13, p. 2898-907, Oct 2009.

CHENG JP; SHAW KE; MONACO CM; HOFFMAN AN; SOZDA CN; OLSEN AS; KLINE AE. A relatively brief exposure to environmental enrichment after experimental traumatic brain injury confers long-term cognitive benefits. **J Neurotrauma**, v. 29, n. 17, p. 2684-8, Nov 20 2012.

CLEMENSON GD; DENG W; GAGE FH. Environmental enrichment and neurogenesis: from mice to humans. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 4, p. 56-62, 8// 2015.

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**, v. 54, n. 3, p. 280-5, May 2015.

CONNOR DE, JR.; NIXON M; NANDA A; GUTHIKONDA B. Vagal nerve stimulation for the treatment of medically refractory epilepsy: a review of the current literature. **Neurosurg Focus**, v. 32, n. 3, p. E12, Mar 2012.

CORDOVA SD; LOSS CM; DE OLIVEIRA DL. Low-intensity physical training recovers object recognition memory impairment in rats after early-life induced Status epilepticus. **Int J Dev Neurosci**, v. 31, n. 3, p. 196-201, May 2013.

COWAN LD. The epidemiology of the epilepsies in children. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev**, v. 8, n. 3, p. 171-81, 2002.

DE MUTSERT R; SUN Q; WILLETT WC; HU FB; VAN DAM RM. Overweight in early adulthood, adult weight change, and risk of type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and certain cancers in men: a cohort study. **Am J Epidemiol**, v. 179, n. 11, p. 1353-65, Jun 1 2014.

DE OLIVEIRA GN; KUMMER A; SALGADO JV; PORTELA EJ; SOUSA-PEREIRA SR; DAVID AS; TEIXEIRA AL. Psychiatric disorders in temporal lobe epilepsy: an overview from a tertiary service in Brazil. **Seizure**, v. 19, n. 8, p. 479-84, Oct 2010.

DE TISI J; BELL GS; PEACOCK JL; MCEVOY AW; HARKNESS WF; SANDER JW; DUNCAN JS. The long-term outcome of adult epilepsy surgery, patterns of seizure remission, and relapse: a cohort study. **Lancet**, v. 378, n. 9800, p. 1388-95, Oct 15 2011.

DISHMAN RK; BERTHOUD HR; BOOTH FW; COTMAN CW; EDGERTON VR; FLESHNER MR; GANDEVIA SC; GOMEZ-PINILLA F; GREENWOOD BN; HILLMAN CH; KRAMER AF; LEVIN BE; MORAN TH; RUSSO-NEUSTADT AA; SALAMONE JD; VAN HOOMISSEN JD; WADE CE; YORK DA; ZIGMOND MJ. Neurobiology of exercise. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14, n. 3, p. 345-56, Mar 2006.

DREOSTI E; LOPES G; KAMPFF AR; WILSON SW. Development of social behavior in young zebrafish. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 9, p. 39, 08/18

06/12/received

07/23/accepted 2015.

DRIELING T; BIEDERMANN NC; SCHARER LO; STROBL N; LANGOSCH JM. [Psychotropic drug-induced change of weight: a review]. **Fortschr Neurol Psychiatr**, v. 75, n. 2, p. 65-80, Feb 2007.

DUBINION JH; DA SILVA AA; HALL JE. Enhanced blood pressure and appetite responses to chronic central melanocortin-3/4 receptor blockade in dietary-induced obesity. **Journal of Hypertension**, v. 28, n. 7, p. 1466-1470, Jul 2010.

EASTER D; O'BRYAN-TEAR CG; VERITY C. Weight gain with valproate or carbamazepine--a reappraisal. **Seizure**, v. 6, n. 2, p. 121-5, Apr 1997.

EGAN RJ; BERGNER CL; HART PC; CACHAT JM; CANAVELLO PR; ELEGANTE MF; ELKHAYAT SI; BARTELS BK; TIEN AK; TIEN DH; MOHNOT S; BEESON E; GLASGOW E; AMRI H; ZUKOWSKA Z; KALUEFF AV. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behav Brain Res**, v. 205, n. 1, p. 38-44, Dec 14 2009.

ELGER C; SCHMIDT D. Modern management of epilepsy: a practical approach. **Epilepsy Behav**, v. 12, n. 4, p. 501-39, May 2008.

ENGEL J. Intractable epilepsy: definition and neurobiology. **Epilepsia**, v. 42 Suppl 6, p. 3, 2001.

ENGESZER RE; RYAN MJ; PARICHY DM. Learned social preference in zebrafish. **Curr Biol**, v. 14, n. 10, p. 881-4, May 25 2004.

FARWELL JR; LEE YJ; HIRTZ DG; SULZBACHER SI; ELLENBERG JH; NELSON KB. Phenobarbital for febrile seizures--effects on intelligence and on seizure recurrence. **N Engl J Med**, v. 322, n. 6, p. 364-9, Feb 8 1990.

FRISCH AJ; ANDERSON TA. The response of coral trout (*Plectropomus leopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23, n. 1, p. 23-34, Jul 2000.

GARTHE A; ROEDER I; KEMPERMANN G. Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis. **Hippocampus**, v. 26, n. 2, p. 261-71, Feb 2016.

GERLAI R; LAHAV M; GUO S; ROSENTHAL A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 67, n. 4, p. 773-82, Dec 2000.

GREENWOOD CE; WINOCUR G. High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. **Neurobiol Aging**, v. 26 Suppl 1, p. 42-5, Dec 2005.

GRIFFITHS SW; BROCKMARK S; HOJESJO J; JOHNSON JI. Coping with divided attention: the advantage of familiarity. **Proc Biol Sci**, v. 271, n. 1540, p. 695-9, Apr 7 2004.

GROSS CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. **Nat Rev Neurosci**, v. 1, n. 1, p. 67-73, Oct 2000.

GROSSMAN L; UTTERBACK E; STEWART A; GAIKWAD S; CHUNG KM; SUCIU C; WONG K; ELEGANTE M; ELKHAYAT S; TAN J; GILDER T; WU N; DILEO J; CACHAT J; KALUEFF AV. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. **Behav Brain Res**, v. 214, n. 2, p. 277-84, Dec 25 2010.

HANNAN AJ. Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. **NeuroPathol Appl Neurobiol**, v. 40, n. 1, p. 13-25, Feb 2014.

HERMANN B; MEADOR KJ; GAILLARD WD; CRAMER JA. Cognition across the lifespan: antiepileptic drugs, epilepsy, or both? **Epilepsy Behav**, v. 17, n. 1, p. 1-5, Jan 2010.

HICKS RR; SMITH DH; LOWENSTEIN DH; SAINT MARIE R; MCINTOSH TK. Mild experimental brain injury in the rat induces cognitive deficits associated with regional neuronal loss in the hippocampus. **J Neurotrauma**, v. 10, n. 4, p. 405-14, Winter 1993.

HOLMES GL. Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. **Epilepsia**, v. 38, n. 1, p. 12-30, Jan 1997.

HONG Y-P; LEE H-C; KIM H-T. Treadmill exercise after social isolation increases the levels of NGF, BDNF, and synapsin I to induce survival of neurons in the hippocampus, and improves depression-like behavior. **Journal of exercise nutrition & biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 11-18, 2015/03// 2015.

HUTCHINSON KM; MCLAUGHLIN KJ; WRIGHT RL; BRYCE ORTIZ J; ANOUTI DP; MIKA A; DIAMOND DM; CONRAD CD. Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity. **Neurobiol Learn Mem**, v. 97, n. 2, p. 250-60, Feb 2012.

IASO/IOTF. Estimating the association between overweight and risk of disease. Disponível em: < <http://www.iaso.org/iotf/obesity/heathimpactobesity/> >. Acesso em: 06/11/2013.

ILIN Y; RICHTER-LEVIN G. Enriched environment experience overcomes learning deficits and depressive-like behavior induced by juvenile stress. **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. e4329, 2009.

INTA D; LANG UE; BORGWARDT S; MEYER-LINDENBERG A; GASS P. Adult neurogenesis in the human striatum: possible implications for psychiatric disorders. **Mol Psychiatry**, v. 21, n. 4, p. 446-7, Apr 2016.

ISOJARVI JI; TAUBOLL E; TAPANAINEN JS; PAKARINEN AJ; LAATIKAINEN TJ; KNIP M; MYLLYLA VV. On the association between valproate and polycystic ovary syndrome: a response and an alternative view. **Epilepsia**, v. 42, n. 3, p. 305-10, Mar 2001.

KAPLAN MS. Environment complexity stimulates visual cortex neurogenesis: death of a dogma and a research career. **Trends Neurosci**, v. 24, n. 10, p. 617-20, Oct 2001.

KAPLAN PW. Obsessive-compulsive disorder in chronic epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 22, n. 3, p. 428-32, Nov 2011.

KARI G; RODECK U; DICKER AP. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. **Clin Pharmacol Ther**, v. 82, n. 1, p. 70-80, Jul 2007.

KETTER TA; POST RM; THEODORE WH. Positive and negative psychiatric effects of antiepileptic drugs in patients with seizure disorders. **Neurology**, v. 53, n. 5 Suppl 2, p. S53-67, 1999.

KLEINDIENST A; MCGINN MJ; HARVEY HB; COLELLO RJ; HAMM RJ; BULLOCK MR. Enhanced Hippocampal Neurogenesis by Intraventricular S100B Infusion Is Associated with Improved Cognitive Recovery after Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 22, n. 6, p. 645-655, 2005/06/01 2005.

KOH S; CHUNG H; XIA H; MAHADEVIA A; SONG Y. Environmental enrichment reverses the impaired exploratory behavior and altered gene expression induced by early-life seizures. **J Child Neurol**, v. 20, n. 10, p. 796-802, Oct 2005.

KOSSOFF EH. More fat and fewer seizures: dietary therapies for epilepsy. **Lancet Neurol**, v. 3, n. 7, p. 415-20, Jul 2004.

KOSSOFF EH; DORWARD JL. The modified Atkins diet. **Epilepsia**, v. 49 Suppl 8, p. 37-41, Nov 2008.

KOSSOFF EH; ROWLEY H; SINHA SR; VINING EP. A prospective study of the modified Atkins diet for intractable epilepsy in adults. **Epilepsia**, v. 49, n. 2, p. 316-9, Feb 2008.

KRAMER AF; ERICKSON KI. Capitalizing on cortical plasticity: influence of physical activity on cognition and brain function. **Trends Cogn Sci**, v. 11, n. 8, p. 342-8, Aug 2007.

KWAN P; BRODIE MJ. Early identification of refractory epilepsy. **N Engl J Med**, v. 342, n. 5, p. 314-9, Feb 3 2000.

LAD HV; LIU L; PAYA-CANO JL; PARSONS MJ; KEMBER R; FERNANDES C; SCHALKWYK LC. Behavioural battery testing: evaluation and behavioural outcomes in 8 inbred mouse strains. **Physiol Behav**, v. 99, n. 3, p. 301-16, Mar 03 2010.

LEDESMA JM; MCROBERT SP. Innate and Learned Shoaling Preferences Based on Body Coloration in Juvenile Mollies, *Poecilia latipinna*. **Ethology**, v. 114, n. 11, p. 1044-1048, 2008.

LELE Z; KRONE PH. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnol Adv**, v. 14, n. 1, p. 57-72, 1996.

LEVIN ED; BENCAN Z; CERUTTI DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiol Behav**, v. 90, n. 1, p. 54-8, Jan 30 2007.

MAGGIONI F; RUFFATTI S; DAINESE F; MAINARDI F; ZANCHIN G. Weight variations in the prophylactic therapy of primary headaches: 6-month follow-up. **J Headache Pain**, v. 6, n. 4, p. 322-4, Sep 2005.

MANUEL R; GORISSEN M; STOKKERMANS M; ZETHOF J; EBBESSON LO; VAN DE VIS H; FLIK G; VAN DEN BOS R. The effects of environmental enrichment and age-related differences on inhibitory avoidance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton). **Zebrafish**, v. 12, n. 2, p. 152-65, Apr 2015.

MARSON AG; AL-KHARUSI AM; ALWAIHDH M; APPLETON R; BAKER GA; CHADWICK DW; CRAMP C; COCKERELL OC; COOPER PN; DOUGHTY J; EATON B; GAMBLE C; GOULDING PJ; HOWELL SJ; HUGHES A; JACKSON M; JACOBY A; KELLETT M; LAWSON GR; LEACH JP; NICOLAIDES P; ROBERTS R; SHACKLEY P; SHEN J; SMITH DF; SMITH PE; SMITH CT; VANOLI A; WILLIAMSON PR; GROUP SS. The SANAD study of effectiveness of valproate, lamotrigine, or topiramate for generalised and unclassifiable epilepsy: an unblinded randomised controlled trial. **Lancet**, v. 369, n. 9566, p. 1016-26, Mar 24 2007.

MATHUR P; LAU B; GUO S. Conditioned place preference behavior in zebrafish. **Nat. Protocols**, v. 6, n. 3, p. 338-345, 02//print 2011.

MAXIMINO C; DE BRITO TM; COLMANETTI R; PONTES AA; DE CASTRO HM; DE LACERDA RI; MORATO S; GOUVEIA A, JR. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. **Behav Brain Res**, v. 210, n. 1, p. 1-7, Jun 26 2010.

MAXIMINO C; MARQUES DE BRITO T; DIAS CA; GOUVEIA A, JR.; MORATO S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nat Protoc**, v. 5, n. 2, p. 209-16, Feb 2010.

MCTIGUE K; LARSON JC; VALOSKI A; BURKE G; KOTCHEN J; LEWIS CE; STEFANICK ML; VAN HORN L; KULLER L. Mortality and cardiac and vascular outcomes in extremely obese women. **JAMA**, v. 296, n. 1, p. 79-86, Jul 5 2006.

MING GL; SONG H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 687-702, May 26 2011.

MORRELL LJ; JAMES R. Mechanisms for aggregation in animals: rule success depends on ecological variables. **Behavioral Ecology**, v. 19, n. 1, p. 193-201, January 1, 2008 2008.

MORRIS GL, 3RD; GLOSS D; BUCHHALTER J; MACK KJ; NICKELS K; HARDEN C. Evidence-based guideline update: vagus nerve stimulation for the treatment of epilepsy: report of the guideline development subcommittee of the american academy of neurology. **Epilepsy Curr**, v. 13, n. 6, p. 297-303, Nov 2013.

NABBOU R; DULAC O. Epileptic syndromes in infancy and childhood. **Curr Opin Neurol**, v. 21, n. 2, p. 161-6, Apr 2008.

NAWROCKI L; BREMILLER R; STREISINGER G; KAPLAN M. Larval and adult visual pigments of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Vision Res**, v. 25, n. 11, p. 1569-76, 1985.

NITHIANANTHARAJAH J; HANNAN AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 9, p. 697-709, Sep 2006.

NOKIA MS; LENSU S; AHTIAINEN JP; JOHANSSON PP; KOCH LG; BRITTON SL; KAINULAINEN H. Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. **J Physiol**, v. 594, n. 7, p. 1855-73, Apr 1 2016.

PEREIRA LO; ARTENI NS; PETERSEN RC; DA ROCHA AP; ACHAVAL M; NETTO CA. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. **Neurobiol Learn Mem**, v. 87, n. 1, p. 101-8, Jan 2007.

PHAM M; RAYMOND J; HESTER J; KYZAR E; GAIKWAD S; BRUCE I; FRYAR C; CHANIN S; ENRIQUEZ J; BAGAWAN DOSS S; ZAPOLSKY I; GREEN J; STEWART AM; ROBISON BD; KALUEFF AV. Assessing Social Behavior Phenotypes in Adult Zebrafish: Shoaling, Social Preference, and Mirror Biting Tests. In: KALUEFF, V. A. e STEWART, M. A. (Ed.). **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. p.231-246. ISBN 978-1-61779-597-8.

PLIOPLYS S; DUNN DW; CAPLAN R. 10-year research update review: psychiatric problems in children with epilepsy. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 46, n. 11, p. 1389-402, Nov 2007.

REILLY CJ. Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in childhood epilepsy. **Res Dev Disabil**, v. 32, n. 3, p. 883-93, May-Jun 2011.

ROCHA LL; LOPEZ-MERAZ ML; NIQUET J; WASTERLAIN CG. Do single seizures cause neuronal death in the human hippocampus? **Epilepsy Curr**, v. 7, n. 3, p. 77-81, May-Jun 2007.

ROSEMBERG DB; RICO EP; MUSSULINI BH; PIATO AL; CALCAGNOTTO ME; BONAN CD; DIAS RD; BLASER RE; SOUZA DO; DE OLIVEIRA DL. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19397, 2011.

ROY V; BELZUNG C; DELARUE C; CHAPILLON P. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. **Physiol Behav**, v. 74, n. 3, p. 313-20, Oct 2001.

RUTTEN A; VAN ALBADA M; SILVEIRA DC; CHA BH; LIU X; HU YN; CILIO MR; HOLMES GL. Memory impairment following status epilepticus in immature rats: time-course and environmental effects. **Eur J Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 501-13, Aug 2002.

SALE A; BERARDI N; MAFFEI L. Enrich the environment to empower the brain. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 4, p. 233-9, Apr 2009.

SALVANES AG; MOBERG O; EBBESSON LO; NILSEN TO; JENSEN KH; BRAITHWAITE VA. Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. **Proc Biol Sci**, v. 280, n. 1767, p. 20131331, Sep 22 2013.

SAVERINO C; GERLAI R. The social zebrafish: behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish. **Behav Brain Res**, v. 191, n. 1, p. 77-87, Aug 5 2008.

SCHLESINGER S; ALEKSANDROVA K; PISCHON T; FEDIRKO V; JENAB M; TREPO E; BOFFETTA P; DAHM CC; OVERVAD K; TJONNELAND A; HALKJAER J; FAGHERAZZI G; BOUTRON-RUAULT MC; CARBONNEL F; KAAKS R; LUKANOVA A; BOEING H; TRICHOPOULOU A; BAMIA C; LAGIOU P; PALLI D; GRIONI S; PANICO S; TUMINO R; VINEIS P; BUENO-DE-MESQUITA HB; VAN DEN BERG S; PEETERS PH; BRAATEN T; WEIDERPASS E; QUIROS JR; TRAVIER N; SANCHEZ MJ; NAVARRO C; BARRICARTE A; DORRONSORO M; LINDKVIST B; REGNER S; WERNER M; SUND M; KHAW KT; WAREHAM N; TRAVIS RC; NORAT T; WARK PA; RIBOLI E; NOTHLINGS U. Abdominal obesity, weight gain during adulthood and risk of liver and biliary tract cancer in a European cohort. **Int J Cancer**, v. 132, n. 3, p. 645-57, Feb 1 2013.

SCHROEDER P; JONES S; YOUNG IS; SNEDDON LU. What do zebrafish want? Impact of social grouping, dominance and gender on preference for enrichment. **Lab Anim**, v. 48, n. 4, p. 328-37, Oct 2014.

SERRA EL; MEDALHA CC; MATTIOLI R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 12, p. 1551-3, Dec 1999.

SHINNAR S; PELLOCK JM. Update on the epidemiology and prognosis of pediatric epilepsy. **J Child Neurol**, v. 17 Suppl 1, p. S4-17, Jan 2002.

SIDENVALL R; FORSGREN L; BLOMQUIST H; HEIJBEL J. A community-based prospective incidence study of epileptic seizures in children. **Acta Paediatr**, v. 82, n. 1, p. 60-5, Jan 1993.

SIDENVALL R; FORSGREN L; BLOMQUIST HK; HEIJBEL J. A community-based prospective incidence study of epileptic seizures in children. **Acta Paediatr**, v. 82, n. 1, p. 60-5, Jan 1993.

SIMAO F; PORTO JA; NUNES ML. Effects of enriched environment in spatial learning and memory of immature rats submitted to early undernourish and seizures. **Int J Dev Neurosci**, v. 30, n. 5, p. 363-7, Aug 2012.

SLEIMAN SF; HENRY J; AL-HADDAD R; EL HAYEK L; ABOU HAIDAR E; STRINGER T; ULJA D; KARUPPAGOUNDER SS; HOLSON EB; RATAN RR; NINAN I; CHAO MV. Exercise promotes the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) through the action of the ketone body β -hydroxybutyrate. **eLife**, v. 5, p. e15092, 2016/06/02 2016.

SPENCE R; MAGURRAN AE; SMITH C. Spatial cognition in zebrafish: the role of strain and rearing environment. **Anim Cogn**, v. 14, n. 4, p. 607-12, Jul 2011.

SPRAGUE J; CLEMENTS D; CONLIN T; EDWARDS P; FRAZER K; SCHAPER K; SEGERDELL E; SONG P; SPRUNGER B; WESTERFIELD M. The Zebrafish Information Network (ZFIN): the zebrafish model organism database. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 1, p. 241-3, Jan 1 2003.

STEENBERGEN PJ; RICHARDSON MK; CHAMPAGNE DL. Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: a pharmacological study. **Behav Brain Res**, v. 222, n. 1, p. 15-25, Sep 12 2011.

STEINHOFF BJ; BEN-MENACHEM E; RYVLIN P; SHORVON S; KRAMER L; SATLIN A; SQUILLACOTE D; YANG H; ZHU J; LAURENZA A. Efficacy and safety of adjunctive perampanel for the treatment of refractory partial seizures: a pooled analysis of three phase III studies. **Epilepsia**, v. 54, n. 8, p. 1481-9, Aug 2013.

STEPHEN LJ; BRODIE MJ. Epilepsy in elderly people. **Lancet**, v. 355, n. 9213, p. 1441-6, Apr 2000.

SUN H; WU H; YU X; ZHANG G; ZHANG R; ZHAN S; WANG H; BU N; MA X; LI Y. Angiotensin II and its receptor in activated microglia enhanced neuronal loss and cognitive impairment following pilocarpine-induced status epilepticus. **Mol Cell Neurosci**, v. 65, p. 58-67, Mar 2015.

THOMPSON PJ; DUNCAN JS. Cognitive decline in severe intractable epilepsy. **Epilepsia**, v. 46, n. 11, p. 1780-7, Nov 2005.

THURMAN DJ; BEGHI E; BEGLEY CE; BERG AT; BUCHHALTER JR; DING D; HESDORFFER DC; HAUSER WA; KAZIS L; KOBAYASHI R; KRONER B; LABINER D; LIOW K; LOGROSCINO G; MEDINA MT; NEWTON CR; PARKO K; PASCHAL A; PREUX PM; SANDER JW; SELASSIE A; THEODORE W; TOMSON T; WIEBE S; EPIDEMIOLOGY ICO. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. **Epilepsia**, v. 52 Suppl 7, p. 2-26, Sep 2011.

TOMS CN; ECHEVARRIA DJ. Back to basics: searching for a comprehensive framework for exploring individual differences in zebrafish (*Danio rerio*) behavior. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 325-40, Aug 2014.

TURKER S; SEVERCAN M; ILBAY G; SEVERCAN F. Epileptic seizures induce structural and functional alterations on brain tissue membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1838, n. 12, p. 3088-3096, 12// 2014.

VAN PRAAG H; CHRISTIE BR; SEJNOWSKI TJ; GAGE FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13427-31, Nov 1999.

VERROTTI A; BASCIANI F; DE SIMONE M; TROTTA D; MORGESE G; CHIARELLI F. Insulin resistance in epileptic girls who gain weight after therapy with valproic acid. **J Child Neurol**, v. 17, n. 4, p. 265-8, Apr 2002.

VITEVA E. Impact of stigma on the quality of life of patients with refractory epilepsy. **Seizure**, v. 22, n. 1, p. 64-69, 1// 2013.

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**, v. 101, n. 1, p. 32-9, Aug 4 2010.

WAALER PE; BLOM BH; SKEIDSVOLL H; MYKLETUN A. Prevalence, classification, and severity of epilepsy in children in western Norway. **Epilepsia**, v. 41, n. 7, p. 802-10, Jul 2000.

WAFER LN; JENSEN VB; WHITNEY JC; GOMEZ TH; FLORES R; GOODWIN BS. Effects of Environmental Enrichment on the Fertility and Fecundity of Zebrafish (*Danio rerio*). **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 55, n. 3, p. 291-4, 2016.

WANG J; LIU C; MA F; CHEN W; LIU J; HU B; ZHENG L. Circadian clock mediates light/dark preference in zebrafish (*danio rerio*). **Zebrafish**, v. 11, n. 2, p. 115-21, Apr 2014.

WHELESS JW; CLARKE DF; CARPENTER D. Treatment of Pediatric Epilepsy: Expert Opinion, 2005. **Journal of Child Neurology**, v. 20, n. 1 suppl, p. S1-S56, December 1, 2005 2005.

WILDEN JA; COHEN-GADOL AA. Evaluation of first nonfebrile seizures. **Am Fam Physician**, v. 86, n. 4, p. 334-40, Aug 15 2012.

WONG K; STEWART A; GILDER T; WU N; FRANK K; GAIKWAD S; SUCIU C; DILEO J; UTTERBACK E; CHANG K; GROSSMAN L; CACHAT J; KALUEFF AV. Modeling seizure-related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish. **Brain Res**, v. 1348, p. 209-15, Aug 12 2010.

WOOD NI; GLYNN D; MORTON AJ. "Brain training" improves cognitive performance and survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **Neurobiol Dis**, v. 42, n. 3, p. 427-37, Jun 2011.

YANG M; OZTURK E; SALZBERG MR; REES S; MORRIS M; O'BRIEN TJ; JONES NC. Environmental enrichment delays limbic epileptogenesis and restricts pathologic synaptic plasticity. **Epilepsia**, v. 57, n. 3, p. 484-94, Mar 2016.

YOUNG D; LAWLOR PA; LEONE P; DRAGUNOW M; DURING MJ. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. **Nat Med**, v. 5, n. 4, p. 448-53, Apr 1999.

ZAAIMI B; GREBE R; BERQUIN P; WALLOIS F. Vagus nerve stimulation induces changes in respiratory sinus arrhythmia of epileptic children during sleep. **Epilepsia**, v. 50, n. 11, p. 2473-80, Nov 2009.

ZAAIMI B; HEBERLE C; BERQUIN P; PRUVOST M; GREBE R; WALLOIS F. Vagus nerve stimulation induces concomitant respiratory alterations and a decrease in SaO₂ in children. **Epilepsia**, v. 46, n. 11, p. 1802-9, Nov 2005.

ZUPANC GK. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. **Brain Behav Evol**, v. 58, n. 5, p. 250-75, 2001a.

_____. A comparative approach towards the understanding of adult neurogenesis. **Brain Behav Evol**, v. 58, n. 5, p. 246-9, 2001b.