

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARTINA BLANK

**PADRONIZAÇÃO DE UM PARADIGMA COMPORTAMENTAL DE ESQUIVA INIBITÓRIA PARA  
*ZEBRAFISH* (*Danio rerio* Hamilton, 1822)**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Mônica R. Vianna

Porto Alegre,  
Agosto de 2009

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARTINA BLANK

**PADRONIZAÇÃO DE UM PARADIGMA COMPORTAMENTAL DE ESQUIVA INIBITÓRIA PARA  
*ZEBRAFISH* (*Danio rerio* Hamilton, 1822)**

Porto Alegre

2009

MARTINA BLANK

**PADRONIZAÇÃO DE UM PARADIGMA COMPORTAMENTAL DE ESQUIVA INIBITÓRIA PARA  
*ZEBRAFISH* (*Danio rerio* Hamilton, 1822)**

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de  
Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular  
da Faculdade de Biociências da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr. Mônica R. Vianna

Porto Alegre,  
Agosto de 2009

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Vianna por sua orientação e por quem tenho enorme admiração e carinho. Agradeço pelos ensinamentos, dedicação, confiança e incentivo. Obrigada pelas oportunidades que você me proporcionou.

Aos meus pais, Markus e Veleida, e ao meu irmão, Andreas, que sempre me apoiaram nas minhas decisões e me incentivaram nos momentos difíceis. Muito obrigada pelo carinho, amor, paciência e principalmente por acreditar em mim. Amo vocês!

À todos os colegas de laboratório pelo auxílio prestado, pelos momentos de aprendizado, pela descontração e amizade. Muito obrigada.

À todos os professores do Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Aos meus amigos pela compreensão e apoio durante todo o tempo. Obrigada por tudo!

Às colegas de jornada, Laura Guerim e Laura Nery, por todas as horas de estudo e de experimentos juntas, todo o trabalho de bancada, incentivo, apoio e carinho.

## RESUMO

Memórias são armazenadas como modificações estruturais e funcionais das conexões sinápticas nas regiões neurais envolvidas no aprendizado e, por sua relevância biológica e relação com patologias do sistema nervoso humanas, a busca pela elucidação dos mecanismos responsáveis por sua manutenção tem recebido interesse de distintas áreas do conhecimento ao longo dos anos. Estudos sobre os mecanismos neurais das memórias de longa duração demonstraram que sua formação é um processo gradual que envolve substratos neuroanatômicos e celulares agora conhecidos em grande extensão, e cujas bases moleculares são alvo de intensa investigação. O peixe teleósteo *zebrafish* é um excelente modelo animal para estudos genéticos e de desenvolvimento e vêm mostrando enorme potencial para estudos de aprendizagem e memória. Este vertebrado de fácil manipulação apresenta rápido desenvolvimento externo e manutenção prática e econômica. Em termos neuroanatômicos, apesar das diferenças entre aspectos do desenvolvimento e resultante disposição de regiões cerebrais de mamíferos e teleósteos, a organização geral do encéfalo do *zebrafish* segue padrões típicos dos vertebrados. Avanços recentes no conhecimento demonstram que há uma extensa similaridade, tanto em complexidade quanto em funcionamento entre o cérebro de peixes teleósteos e os vertebrados terrestres o que valida o uso deste modelo animal para estudo dos mecanismos conservados do aprendizado e memória. Embora já existam na literatura científica estudos avaliando parâmetros comportamentais do *zebrafish*, na maior parte das vezes o foco principal dos trabalhos não é a cognição. Aspectos como locomoção e exploração do ambiente são tomadas como medidas e os trabalhos publicados não mostram constância em relação às tarefas utilizadas e protocolos adotados. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um novo paradigma de esQUIVA inibitória para *zebrafish* a fim de permitir a avaliação dos mecanismos celulares e moleculares da formação de memória em vertebrados. Para tanto, o treino consistiu de apenas uma sessão onde os animais foram colocados individualmente no aquário de esQUIVA inibitória. Ao cruzar para o lado escuro do aquário um choque elétrico foi administrado por 5s e estes animais retirados imediatamente do aquário. Na sessão de teste, realizada 24 h depois, seguiu-se o mesmo protocolo, porém nenhum choque foi utilizado. As latências de entrada no lado escuro para o treino e o teste foram consideradas como indicadoras de retenção. Para a validação da tarefa um grupo de animais foi tratado durante 15 min pós-treino com o antagonista de receptor NMDA MK-801 numa concentração de 20  $\mu$ M. Os resultados obtidos demonstram que a tarefa de esQUIVA inibitória desenvolvida para *zebrafish* é baseada em mecanismos conservados em que o aprendizado, e resultante memória, são dependentes de sinalização glutamatérgica mediada por NMDA, assim como já evidenciado para outros vertebrados. A tarefa desenvolvida é rápida, simples e resulta em um aprendizado robusto, sólido e persistente, representando um instrumento valioso para se caracterizar diferentes processos que afetam o comportamento no *zebrafish*, bem como permitir a dissecação dos eventos tempos-dependentes da formação de memórias de vertebrados.

Palavras-chaves: *Zebrafish*. EsQUIVA inibitória. Aprendizado. Memória. Antagonista do receptor NMDA.

## ABSTRACT

Memories are stored as structural and functional changes of the synaptic connections in neural regions involved in learning. Due to its biological relevance and relation to pathologies of the human nervous system, the pursuit for elucidation of the mechanisms underlying its maintenance is receiving enormous interest from distinct areas of knowledge over the years. Studies on the neural mechanisms of long-term memories have demonstrated that its formation is a gradual process involving neuroanatomical and cellular substrates, and whose molecular bases are the target of intense research. The teleost fish zebrafish is an excellent animal model for genetic and developmental studies and has a great potential for studies of learning and memory. This vertebrate is easy to manipulate and has a fast external development demanding practical and economical maintenance. Neuroanatomically, despite differences on developmental aspects and brain regions' disposition, the general organization of mammal and teleost brains follow typical vertebrates' patterns. Recent advances have shown that there is extensive similarity in both complexity and functioning of teleosts fish and terrestrial vertebrates brains, which validates the use of this animal model to study conserved mechanisms of learning and memory. Although there are studies evaluating behavior of zebrafish, they are mainly focused on locomotion and exploration of the environment in detriment of cognition. Moreover, there is no consistency in relation to the tasks protocols used. In the present study we demonstrate a rapid and effective learning protocol of a single-trial inhibitory avoidance to zebrafish that would allow the evaluation of cellular and molecular mechanisms of memory formation in vertebrates. In a simple apparatus animals learn to avoid swimming from a white into a dark compartment in order to circumvent an electric shock in a single training session. The retention test was performed 24 h after training. The test session repeated the training protocol except that no shock was administered. Latencies to enter the dark environment were considered indication of retention. In order to demonstrate the task potential use in further studies aiming to characterize the effect of pharmacological treatments that alter animals' cognitive performance, we investigated the effect of the NMDA-receptor antagonist on inhibitory avoidance memory. Immediately after training animals were treated with 20  $\mu$ M of MK-801 during 15 min, which prevented memory formation. Our results shows that the resulting memory for this task is robust, long-lasting and sensitive to NMDA blockage, in accordance to data from other vertebrates. This is a powerful instrument for evaluate memory processes and many other studies may benefit from this task. Together with complementary strategies available for zebrafish it may significantly improve our current knowledge on learning and memory mechanisms.

Keywords: *Zebrafish*. Inhibitory avoidance. Learning. Memory. NMDA-receptor antagonist.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. MEMÓRIA E PLASTICIDADE SINÁPTICA.....	10
1.2. ZEBRAFISH (DANIO RERIO).....	16
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO.....	22
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
REFERÊNCIAS.....	31
ANEXO – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	39

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 MEMÓRIA E PLASTICIDADE SINÁPTICA

O processo pelo qual adquirimos as informações sobre o mundo é conhecido como aprendizado (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007) e memória é o modo como armazenamos estas informações.

A capacidade de adquirir novas informações é uma das mais importantes do sistema nervoso e a expressão de memórias previamente adquiridas é crucial para a sobrevivência e evolução das espécies. Evidências clínicas e experimentais há muito demonstram que as memórias não consistem em um processo único, variando, em conteúdo, declarativas (e explícitas quando tratando de seu equivalente em animais experimentais) ou procedurais (implícitas), (MARKOWITSCH, 1997); e em duração (THOMPSON; KIM, 1996; MARKOWITSCH, 1997; FUSTER, 1998; IZQUIERDO *et al.*, 1999, 2000). Memórias procedurais são gradativamente adquiridas e uma vez estabelecidas são evocadas de maneira inconsciente e constituem traços extremamente duradouros. Já as memórias declarativas, sobre fatos, eventos ou conhecimentos, são conscientemente adquiridas e evocadas, podendo variar amplamente em sua duração. Além disso, tais memórias utilizam substratos neuroanatômicos distintos: enquanto as memórias procedurais são processadas por sistemas sensoriais e motores relacionados com a execução das habilidades aprendidas, as memórias declarativas dependem da integridade funcional das estruturas do lobo temporal e diencefálico, especialmente do hipocampo (EICHENBAUM, 1996; EICHENBAUM, 1999; RIEDEL; MICHEAU, 1999). De acordo com o tempo durante o qual são retidas, as memórias são divididas em dois tipos principais: memórias de curta duração, retidas por minutos ou horas após o aprendizado, ou memórias de longa duração, que persistem dias, anos ou mesmo uma vida inteira (FUSTER, 1998).

### 1.1.1 Mecanismos celulares e moleculares envolvidos na formação de memórias

Nos anos 1900, Müller e Pilzecker, propuseram que a formação de memória permanente necessita de tempo e, que durante este tempo, a memória permanece vulnerável podendo ser substituída ou interrompida por outras informações (MUELLER; PILZECKER, 1900 *apud* McGAUGH, 2000; MEDINA *et al.*, 2008)<sup>1</sup>. O processo pelo qual a memória se torna estável é referido como consolidação.

Desde muito tempo assume-se que o cérebro armazena as informações através de alterações na eficácia de suas conexões em âmbito celular. O neuroanatomista espanhol Santiago Ramón y Cajal foi um dos primeiros, em 1911, a propor que para formar memórias, conexões neurais deviam tornar-se mais estáveis. Cajal sugeriu que novos conhecimentos eram representados por alterações nas conexões neurais já existentes e não por um aumento no número de células neurais (RAMÓN Y CAJAL, 1952 *apud* MILLER, 2005)<sup>2</sup>. Apesar de sugerir-se que a memória de longa duração se consolida tornando-se estável e imutável, Lewis, em 1979, demonstrou que a memória quando reativada entra em um estado dinâmico e frágil, requerendo posterior estabilização via alterações sinápticas e síntese protéica para se tornar disponível novamente, este processo é denominado de reconsolidação (LEWIS, 1979 *apud* ALBERINI, 2005)<sup>3</sup>.

Atualmente a idéia de que mecanismos dinâmicos de plasticidade nos circuitos neurais codificam e armazenam as memórias de longa duração é sustentada por inúmeras evidências experimentais e muitos eventos celulares envolvidos em alterações morfológicas e funcionais nas sinapses relacionadas com o aprendizado foram identificados na última década (BRUEL-JUNGERMAN; DAVIS; LAROCHE, 2007).

Durante os últimos 40 anos, descobriram-se diversos aspectos dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na formação e consolidação da memória (McGAUGH, 1966, 2000; KANDEL, 2001). Atualmente são conhecidos os sistemas de neurotransmissores, principais e moduladores, assim como várias moléculas e enzimas que sinalizam

---

<sup>1</sup> MÜELLER, G.E.; PILZECKER, A. Experimentelle beitrage zur lehre vom gedachtnis. **Zeitschrift für Psychologie**, v.1, p.1–288. 1900.

<sup>2</sup> RAMÓN Y CAJAL, S. Structure and connections of neurons. **Bulletin of the Los Angeles Neurological Society**, v.17, n. 1-2, p. 5-46. 1952.

<sup>3</sup> LEWIS, D.J. Psychobiology of active and inactive memory. **Psychological Bulletin**, v.86, p. 1054–1083. 1979.

as informações recebidas na sinapse e desencadeiam alterações intracelulares que se acredita serem cruciais para as modificações sinápticas que representam as memórias (IZQUIERDO; MEDINA, 1997).

Grande parte do que se conhece atualmente a respeito dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos fenômenos de plasticidade sináptica deve-se a descrição, por Bliss e Lomo (1973) do fenômeno de potenciação de longa duração de sinapses (do inglês *Long term potentiation*, LTP). LTP consiste em um aumento na eficiência da transmissão sináptica em neurônios de regiões como o hipocampo em resposta a estimulação de alta frequência. Ao longo dos anos demonstrou-se que a LTP compartilha inúmeras e importantes características típicas do aprendizado de novas memórias (BLISS; COLINGRIDGE, 1993; IZQUIERDO, 1994; EICHENBAUM, 1996). Assim como as memórias, a LTP é rapidamente estabelecida, permanecendo estável por longos períodos durante os quais é mantida pela combinação de modificações pré e pós-sinápticas (MAREN; BAUDRY, 1995; MALENKA; NICOLL, 1999).

As memórias, então, são armazenadas como modificações estruturais e funcionais das conexões sinápticas nas regiões envolvidas no aprendizado como o hipocampo (EICHENBAUM, 1999). Estas modificações podem ser divididas em duas fases: uma independente da síntese de novas proteínas e RNA que dura de 1-3 horas (memória de curta duração) e outra dependente da síntese de proteína e RNA que dura de várias horas a dias, ou mesmo anos (memória de longa duração) (IZQUIERDO; MEDINA, 1998; McGAUGH, 1966, 2000). Estudos sobre os mecanismos neurais das memórias de longa duração demonstraram que sua formação é um processo gradual, desencadeado pelo aprendizado, e que envolve substratos neuroanatômicos e celulares agora conhecidos em grande extensão, e cujas bases moleculares são alvo de intensa investigação (McGAUGH, 1966, 2000; McGAUGH; IZQUIERDO, 2000; KANDEL 2001).

As memórias de longa duração não são imediatamente adquiridas sob sua forma estável, sendo necessário serem consolidadas (IZQUIERDO; MEDINA, 1997). Estudos em modelos animais têm mostrado que a formação da memória envolve uma série de alterações bioquímicas em várias áreas do sistema nervoso central (SNC), entre as quais se destaca o hipocampo. Os eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória incluem, inicialmente, a ativação de receptores glutamatérgicos dos tipos *N*-metil-D-aspartato (NMDA) e metabotrópico (mGluRs), e a ativação de cascatas bioquímicas nos neurônios.

Os processos moleculares que subjazem as modificações sinápticas necessárias para a formação de memórias de longa duração têm mostrado que a ativação das vias mediadas por

cálcio e adenosina mono-fosfato cíclico (AMPc) é um passo necessário para o estabelecimento da memória de longa duração e que a regulação aumentada destas cascatas pelo aprendizado induz a expressão de genes relacionados com a plasticidade sináptica, agindo na maioria das vezes com a coincidente ativação de inúmeras proteíno-quinases, como Proteíno-quinase A e C (PKA e PKC), Cálcio-Calmodulina quinases (CaMK II e CaMK IV) e Proteíno-quinases Ativadas por Mitógeno (MAPK), e a fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta a AMPc (CREB) com conseqüente ativação gênica e síntese protéica (Figura 1) (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; McGAUGH; IZQUIERDO, 2000; McGAUGH, 2000; CAMMAROTA *et al.*, 2000; IZQUIERDO, 2006; MEDINA *et al.*, 2008). Este fenômeno parece ser um fenômeno inerente à consolidação da memória de longa duração nos diversos testes e nas diversas espécies de animais (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; McGAUGH; IZQUIERDO, 2000; KANDEL, 2001).

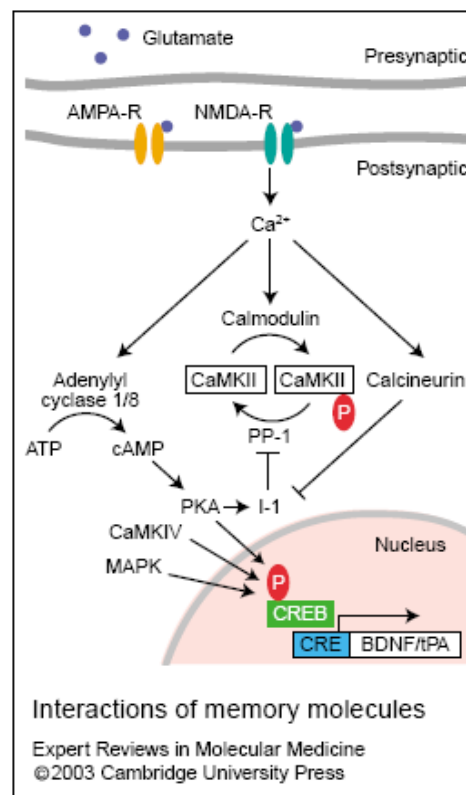


Figura 1 - Interações das moléculas envolvidas na formação da memória.

Fonte: DUNNING J. & DURING M.J., 2003, p. 4.

Modificações covalentes como as induzidas pelas proteínas quinases, contudo, não são permanentes e por isso incapazes de manter as representações celulares de uma memória por muito tempo. Sabe-se pouco sobre os mecanismos celulares e moleculares que continuam e mantêm por várias horas ou dias a memória de longa duração. A maioria dos estudos têm apenas avaliado os efeitos de tratamentos que interferem com a manutenção das memórias quando administrados pré-e pós-treino até no máximo 24 horas depois do aprendizado. No entanto, memórias podem durar dias, meses ou até anos. Então, para que estas se tornem permanentes as mudanças precisam persistir após a sua aquisição a fim de evitar sua alteração ou perda (BAILEY; BARTSCH; KANDEL, 1996; McGAUGH, 2000; DUDAI, 2002; BAILEY; KANDEL; SI, 2004). Entre as funções atribuídas às proteínas, cuja síntese é estimulada durante a formação de memórias de longa duração, incluem-se eventos celulares relacionados com a remodelação ultra-estrutural das conexões sinápticas. Atualmente é aceito que o substrato neurobiológico das memórias reside na atividade das modificações na força sináptica e no remodelamento das redes neurais ativadas durante o aprendizado, um processo chamado de estreitamento sináptico. (ANDERSEN; SOLENG, 1998; MURPHY; REGAN, 1998; BRUEL-JUNGERMAN; DAVIS; LAROCHE, 2007).

Mais recentemente, demonstrou-se ainda, que duas outras formas de plasticidade, sinaptogênese, crescimento de novas sinapses funcionais, e neurogênese, o nascimento e crescimento de novos neurônios, originalmente considerados mecanismos exclusivos do desenvolvimento inicial, estão envolvidas em processos de memória no adulto (GOULD *et al.*, 1999; LEUNER *et al.*, 2004; MARKHAM; GREENOUGH, 2004; MING; SONG, 2005; ABROUS *et al.*, 2005; WAITES; CRAIG; GARNER, 2005; RADLEY *et al.*, 2006; KEE *et al.*, 2007).

### **1.1.2 Papel do receptor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) na memória**

Na maioria das sinapses excitatórias do sistema nervoso central, a neurotransmissão é mediada pela ligação do glutamato à receptores localizados na membrana pós-sináptica e subsequente condução iônica através dos canais dos receptores. Há três subtipos de receptores ionotrópicos do glutamato designados NMDA (*N*-methyl-*D*-aspartate), AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) e cainato, que diferem na afinidade que têm pelo neurotransmissor. Destes subtipos, os receptores NMDA são de particular interesse, pois

apesar de serem altamente permeáveis à íons de cálcio quando ativados, em repouso seu canal está bloqueado por íons de magnésio. Sua ativação requer ainda a coincidência da despolarização da membrana e da ligação do glutamato, propriedades consistentes com aquelas observadas para o armazenamento de memórias. Enquanto a transmissão sináptica basal é mediada pelo influxo de íons sódio e potássio através dos receptores AMPA, disparos repetidos do neurônio pré-sináptico acarretam na despolarização da membrana pós-sináptica, removendo o magnésio bloqueador e permitindo o influxo de cálcio através do receptor NMDA ativado (revisado em DUNNING; DURING, 2003; BOURNE; NICOLL, 1993).

A ativação dos receptores do tipo NMDA é considerada o evento crucial desencadeador da plasticidade sináptica associada à formação de memória assim como de LTP (revisado em CASTELLANO; CESTARI; CIAMEI, 2001; BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; MALENKA; NICOLL, 1999). As propriedades únicas do receptor NMDA, sua ativação inicial quando um estímulo é apresentado e conseqüente alterações na conectividade de redes neurais, permitem que este receptor desempenhe um importante papel nos mecanismos celulares mediadores do aprendizado e da memória (DINGLELINE; BORGES; BOWIE; TRAYNELIS, 1999).

Estudos farmacológicos forneceram as primeiras evidências do possível envolvimento dos receptores NMDA na formação de memórias (DAVIS; BUTCHER; MORRIS, 1992). A utilização de antagonistas de receptores NMDA durante o aprendizado em diversas tarefas comportamentais demonstrou causar prejuízo na aquisição e retenção deste, sugerindo uma regulação destes eventos pelo receptor NMDA. Em 1996, com os avanços na área da manipulação genética, uma linhagem de camundongos transgênicos *knockout* para um gene do receptor NMDA pode ser desenvolvida e esta apresentava déficits cognitivos na fase adulta (TSIEN; HUERTA; TONEGAWA, 1996). Os efeitos negativos ou positivos observados durante a formação de memória quando da utilização de antagonistas ou agonistas específicos e o déficit cognitivo apresentado pelo camundongo *knockout* comprovam a importância destes receptores na regulação dos processos sinápticos decorrentes do aprendizado (revisado em RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003).

### 1.1.3 Modelos animais para o estudo de memória

A memória, e seus mecanismos celulares e moleculares, vem sendo estudada há mais de 30 anos em diversos modelos animais como roedores, pintos, mosca-da-fruta (*Drosophila*) e molusco (*Aplysia*) sugerindo que a maquinaria molecular que define a memória é amplamente conservada (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; KANDEL, 2001; MILLER, 2005).

Tendo roedores como os animais de escolha para estudos comportamentais e testes cognitivos por mais de um século, algumas tarefas comportamentais tornaram-se clássicas nos estudos dos distintos tipos de memória (McGAUGH, 2000; McGAUGH; IZQUIERDO, 2000). Dentre estas, a esquiva inibitória tem sido a mais utilizada e considerada aquela que oferece maiores vantagens para estudos de memórias declarativas de variadas durações (GOLD, 1986). Dentre as vantagens desta tarefa estão: sua rápida aquisição de informação na sessão de aprendizado/treino, favorecendo a análise dos mecanismos de formação da memória que seguem a sessão de treino (GOLD, 1986; IZQUIERDO *et al.*, 1999); seu aprendizado dependendo da integridade do circuito anatômico que inclui a região CA1 do hipocampo, região tradicionalmente responsável pelo processamento cognitivo nos mamíferos de forma geral e alvo de alterações patológicas que comprometem a cognição também em humanos (EICHENBAUM, 1996); e sua modulação por projeções adrenérgicas da região da amígdala cerebral, relacionadas com o conteúdo emocional (de forma especial, aversivo e de medo) da informação processada (McGAUGH, 2002).

Os mecanismos de processamento de informação para a aquisição inicial de memórias para esta tarefa são atualmente bem descritos (McGAUGH, 2000; McGAUGH; IZQUIERDO, 2000). Por ser uma tarefa aversiva, que envolve mecanismos conservados evolutivamente relacionados a respostas de medo, esta consiste em uma importante ferramenta em estudos que visem descrever os substratos moleculares e celulares daquelas memórias tradicionalmente relacionadas com patologias comportamentais em humanos, como fobias e estresse pós-traumático (McGAUGH, 2002). Além disso, nesta mesma tarefa, distintos tipos de memória declarativa, como memória de curta e longa duração e o processo de extinção podem ser estudados (VIANNA *et al.*, 1999, 2000 a,b, 2001).

## 1.2 ZEBRAFISH

O *zebrafish*, *Danio rerio*, é um pequeno peixe teleósteo tropical de água doce comum na maioria das *pet shops* que foi primeiramente proposto para estudos de desenvolvimento há mais de 30 anos por George Streisinger (Figura 2). O *zebrafish* pertence à família Cyprinidae, a família de vertebrados mais rica em espécies, e seu habitat natural centraliza-se no nordeste da Índia (SPENCE *et al.*, 2008). As vantagens do uso deste modelo animal, hoje, são bem conhecidas: *zebrafish* é um vertebrado diplóide; seu tamanho é pequeno, de apenas 3-5cm, podendo ser mantido facilmente, com baixos custos e em grande quantidade, o que o torna ideal para estudos de genética; sua reprodução é rápida com fertilização externa gerando grandes quantidades de ovos relativamente grandes, 0,7mm, e transparentes sendo ideais para seu uso em pesquisas de desenvolvimento; seu tempo de geração é curto, 3-4 meses, se tornando ideal para experimentos com seletividade (GUO, 2004; SPENCE *et al.*, 2008).



Figura 2 – *Zebrafish* (*Danio rerio*).

Desde sua introdução em laboratórios, muitos êxitos foram alcançados estabelecendo o *zebrafish* como um organismo genético modelo para a biologia e a medicina (GUO, 2004). Na década de 80, Streisinger estabeleceu os estudos pioneiros genéticos moleculares da embriologia deste animal assim como um *screening* piloto de mutagênese. Posteriormente, Kimmel publicou descrições detalhadas da diferenciação celular e da organização do sistema nervoso do *zebrafish* (SPENCE *et al.*, 2008). Em 1996, o *zebrafish* foi o vertebrado escolhido para se realizar o primeiro *screening* em larga escala de mutagêneses e, a partir destes estudos, gerou-se o projeto genoma do *zebrafish*, iniciado em 2001. O *zebrafish*, hoje, vem se tornando ferramenta para muitas pesquisas com grandes investimentos em diversas áreas,



como ecotoxicologia, fisiologia, neurobiologia, farmacologia, envelhecimento, e, despontando em importância, na área de biomedicina como modelo de estudo de doenças humanas e de drogas terapêuticas (KEY; DEVINE, 2003; GUO, 2004; ZON; PETERSON, 2005; MIKLOSI; ANDREW, 2006).

O grande sucesso deste modelo animal deve-se a facilidade de manutenção e manipulação em relação a outros animais modelo como roedores, combinada a uma complexidade típica de vertebrados que facilita a extrapolação de resultados nele obtidos em relação à humanos de maneira mais direta do que aqueles obtidos em invertebrados (WILLIAMS; WHITE; MESSER, 2002; GUO, 2004; XU *et al.*, 2007; SPENCE *et al.*, 2008).

### 1.2.1 Neuroanatomia

Com relação à neuroanatomia do *zebrafish*, apesar das diferenças entre aspectos do desenvolvimento e resultante disposição de regiões cerebrais de mamíferos e teleósteos, especialmente na região prosencefálica, a organização geral do encéfalo do *zebrafish* segue padrões típicos dos vertebrados (WULLIMANN; MUELLER, 2004). Sugere-se que certas estruturas da região dorso-lateral do telencéfalo e da região dorso-medial telencefálica do *zebrafish* apresentem homologia com a formação hipocampal e amígdala respectivamente dos demais vertebrados (Figura 3), ambas as regiões importantes para o estudo da cognição (PORTAVELLA *et al.*, 2002; TROPEPE; SILVE, 2003; WULLIMANN; MUELLER, 2004; SALAS *et al.*, 2006).

Avanços recentes no conhecimento sobre desenvolvimento, anatomia e função do sistema nervoso demonstram que há uma extensa similaridade, tanto em complexidade quanto em funcionamento entre o cérebro de peixes teleósteos e os vertebrados terrestres (SALAS *et al.*, 2006), sugerindo também a conservação das propriedades neuroanatômicas e celulares, base para o aprendizado e a memória. Recentemente demonstrou-se que a LTP no telencéfalo de *zebrafish* é dependente de transmissão glutamatérgica e é bloqueada por inibição farmacológica do receptor de NMDA (NAM; KIM; LEE, 2004).

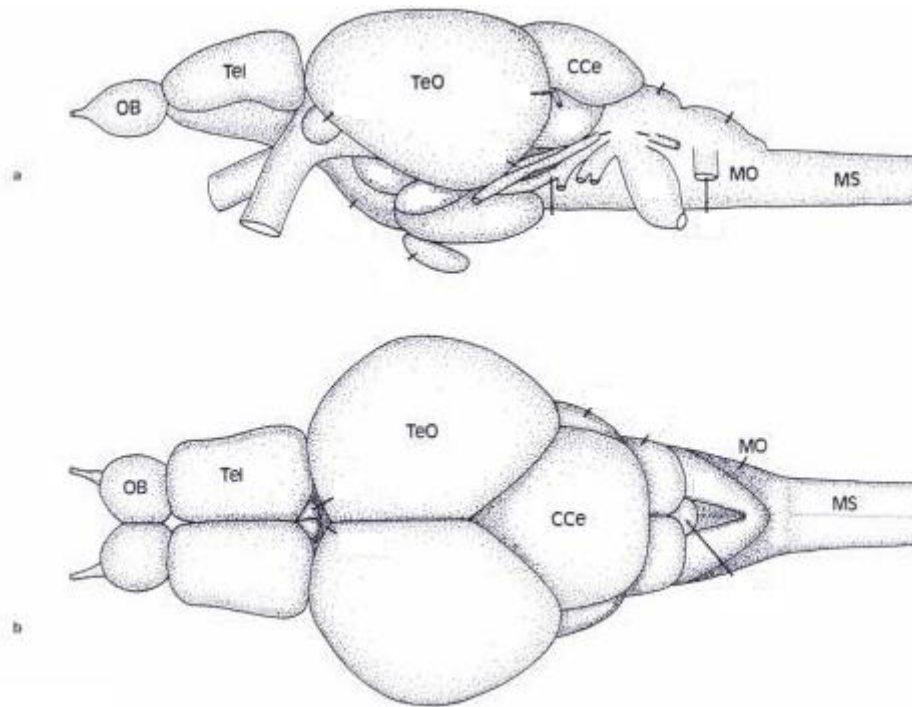


Figura 3 - Sistema nervoso central de *zebrafish* mostrando as estruturas macroanatômicas. A. Visão lateral B. Visão dorsal. OB = Bulbo Olfatório; Tel = Telencéfalo; TeO = *tectum* Óptico; Cce = Cerebelo; MO = Medula Oblonga; MS = Medula espinhal.

Fonte: adaptado de WULLIMANN; MUELLER, 2004. p.147.

Estas evidências sugerem um ancestral comum aos vertebrados em questão que já dispunha de um repertório anatômico e histológico capaz de garantir o desempenho de funções cognitivas complexas (SALAS *et al.*, 2006).

Em mamíferos, a cognição espacial e o comportamento envolvem a interação de múltiplos mecanismos neurais, e dependem de sistemas baseados em estruturas e circuitos cerebrais telencefálicos e não telencefálicos. Embora não se tenha toda essa quantidade de informações sobre os teleósteos, neles também já se demonstrou haver circuitos cerebrais telencefálicos e não telencefálicos responsáveis por diferentes aspectos da cognição e do comportamento motor. Evidenciou-se que lesões ou ablações na região do telencéfalo causam déficits de aprendizado e memória, mas não prejudicam o uso de estratégias para a orientação espacial do animal (movimento da cabeça, coordenação dos olhos, movimentação em geral) sendo os centros cerebrais não telencefálicos, como o *tectum* óptico e o cerebelo, implicados nestes processos (LOPEZ, 2000; PORTAVELLA *et al.*, 2002; SALAS *et al.*, 2006). Estas, e outras evidências que demonstram grande concentração de receptores NMDA na região do telencéfalo, validam o uso de peixes teleósteos, por exemplo, o *zebrafish*, como modelo útil

na avaliação do comportamento de vertebrados em estudos que relacionem o comportamento com achados celulares e moleculares em regiões anatômicas específicas.

### 1.2.2 Estudos de memória em *zebrafish*

Como descrito anteriormente, o *zebrafish* representa um modelo vertebrado com grande potencial para estudos de aprendizado e memória uma vez que permite a identificação de genes e seus produtos envolvidos com os processos cognitivos de maneira fácil, barata e eficiente (GUO, 2004; SALAS et al., 2006; XU et al., 2007; AL-IMARI; GERLAI, 2008).

A caracterização do aprendizado e da memória em *zebrafish* vem avançando rapidamente. Enquanto mutantes genéticos em larga escala vêm sendo desenvolvidos, estudos comportamentais sobre o funcionamento do aprendizado e da memória neste modelo animal são requeridos (XU et al., 2007; AL-IMARI; GERLAI, 2008).

Os primeiros estudos de condicionamento em *zebrafish* datam da década de 70 (COLWILL et al., 2005) e vários tipos e aspectos do processo cognitivo têm sido estudados. Entre eles, Darland e Dowling, em 2001, desenvolveram uma tarefa de preferência de lugar induzido por cocaína para estudar o comportamento do *zebrafish*. Williams, White, Messer (2002) e Bilotta et al. (2005) estudaram tarefas relacionadas à recompensa por comida e verificaram que o *zebrafish* aprende de forma rápida demonstrando altos níveis de acertos em 2 dias a partir do início do treino. Colwill et al. (2005) estudou a discriminação visual do *zebrafish* relacionado à recompensa por comida. Em 2007, Xu et al. demonstraram que o *zebrafish* é capaz de aprender uma tarefa de condicionamento por esquiva ativa. E Best et al. (2008) estudaram a habituação em larvas recém-eclodidas (COLWILL et al., 2005).

Estudos recentes corroboram as evidências anteriores de que o *zebrafish* consegue aprender quando exposto à eventos aversivos (PRADEL; SCHACHNER; SCHMIDT, 1999; PRADEL; SCHMIDT; SCHACHNER, 2000; LEVIN; CHEN, 2004; RAWASHDEH et al., 2007). Muitos protocolos vêm sendo desenvolvidos (PRADEL et al., 1999, 2000; YU et al., 2006; RAWASHDEH et al., 2007; XU et al., 2007), mas ainda não existe uma constância em relação às tarefas utilizadas e o foco principal de muitos trabalhos não é a cognição como fenômeno e aspectos como locomoção e exploração do ambiente são tomadas como medidas secundárias de bem-estar.

Dentre os trabalhos encontrados na literatura do *zebrafish*, Schachner *et al.* (2000), desenvolveram um protocolo de esquiva ativa no qual o *zebrafish* é treinado num aquário dividido ao meio por uma barreira. O peixe deveria cruzar esta barreira em cada tentativa (*trial*) para evitar o choque elétrico (estímulo não condicionado) administrado 12s após o acender de um sinal de luz vermelha (estímulo condicionado) que permanecia ligada por no máximo 50s ou até o peixe atravessar a barreira. Subseqüentemente, os estímulos, condicionado e não condicionado, eram desligados e trocados de lado. O treino consistia de até 40 tentativas. Os peixes que alcançavam o critério de 8 acertos em 10 tentativas foram designados de aprendizes (*learners*) (PRADEL; SCHACHNER; SCHMIDT, 1999; PRADEL; SCHMIDT; SCHACHNER, 2000). No trabalho de Zhdanova *et al.*, o aquário era dividido em um compartimento branco e outro vermelho. Os peixes recebiam choque toda vez que passavam do lado branco para o lado vermelho (YU *et al.*, 2006). No grupo de Xu, utilizou-se um aquário dividido por uma barreira opaca com uma lâmpada e dois eletrodos em cada lado do aquário. A tarefa de treino consistia em uma habituação de 5 min do peixe ao aquário e então uma luz era acesa no lado em que o peixe se encontrava e após 12s administravam-se choques elétricos por mais 12s ou até o peixe atravessar para o lado oposto ao da luz. Um intervalo de tempo era concedido e começava-se nova tentativa (XU *et al.*, 2007). Já Cahill *et al.*, adaptaram o protocolo de esquiva ativa do grupo de Schachner e este novo protocolo aumenta a voltagem do choque para 7.3 V. O treino consiste numa lâmpada vermelha que acende, no lado oposto ao compartimento do peixe, por até 20s e após 10s da luz acesa o choque é administrado. Os peixes que atingiam o critério de 8 acertos em 10 tentativas eram considerados aprendizes (RAWASHDEH *et al.*, 2007).

Outros autores têm trabalhado no desenvolvimento de paradigmas para peixes incluindo *goldfish* (FAGANELLO; MATTIOLLI, 2008) e *zebrafish* (DE CASTRO *et al.*, 2009), que mais se assemelhem a tarefas de esquiva inibitória de roedores, embora os resultados obtidos sugiram que as memórias formadas nestas tentativas não sejam robustas ou estáveis a fim de permitir seu uso em estudos de memória mais abrangentes.

Por ser a tarefa mais amplamente utilizada em estudo com roedores e, portanto, aquela usada para extrapolação de resultados para humanos há a necessidade de se desenvolver um protocolo válido de esquiva inibitória para *zebrafish*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um paradigma comportamental de esquiva inibitória para *zebrafish*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um paradigma comportamental de esquiva inibitória para *zebrafish*;
- Avaliar o efeito do bloqueio do receptor NMDA durante o período de formação da memória da tarefa de esquiva inibitória para *zebrafish*.

## **CAPÍTULO 2**

### **ARTIGO CIENTÍFICO**

A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition  
of an NMDA-dependent long-term memory

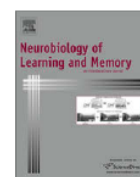
Martina Blank, Laura D. Guerim, Reinaldo F. Cordeiro, Monica R. M. Vianna

Artigo aceito para publicação no periódico *Neurobiology of Learning and Memory*  
(doi:10.1016/j.nlm.2009.07.001)



Contents lists available at ScienceDirect

## Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ynlme](http://www.elsevier.com/locate/ynlme)

## A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory

Martina Blank, Laura D. Guerim, Reinaldo F. Cordeiro, Monica R.M. Vianna \*

Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 27 March 2009

Revised 29 June 2009

Accepted 3 July 2009

Available online xxx

## Keywords:

Zebrafish

Inhibitory avoidance

Memory

NMDA-receptor antagonist

## ABSTRACT

The behavioral tasks aiming to evaluate learning and memory mechanisms currently available to zebrafish (*Danio rerio*) involve long training sessions frequently along multiple days and are based on shuttle box or active-avoidance protocols, preventing a detailed analysis of cellular and molecular time-dependent processes involved in memory acquisition and consolidation. In order to explore zebrafish's potential contribution to the characterization of the molecular machinery underlying learning and memory rapidly acquired and reliable paradigms are necessary. In this study we present a rapid and effective learning protocol in a single-trial inhibitory avoidance in zebrafish. In a simple apparatus, adult animals learned to refrain from swimming from a white into a dark compartment in order to avoid an electric shock during a single-trial training session that lasted less than 2 min. The resulting memory is robust, long-lasting and sensitive to NMDA-receptor antagonist MK-801 given in the tank water immediately after training. Experiments aiming to further characterize the events underlying memory formation, retrieval or extinction or those looking for cognitive profiling of mutants, neurotoxicological studies and disease models may benefit from this task, and together with complementary strategies available for zebrafish may significantly improve our current knowledge on learning and memory mechanisms.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The teleost *Danio rerio* popularly known as zebrafish emerged as a model organism to genetic studies of vertebrates' developmental mechanisms more than three decades ago when Streisinger et al. used chemical mutagenesis to subsequently evaluate mutations affecting the transparent embryo ontogenesis (Streisinger, Walker, Dower, Knauber, & Singer, 1981). The following advances on large-scale genetic screenings – until then restricted to invertebrates – and the continuously expanding molecular resources available promoted zebrafish to the position of a prominent vertebrate model for developmental and genetics studies. In disrespect of its size, prolific reproductive capacity and easy maintenance, zebrafish maintains a typical vertebrate systems complexity, and accumulating evidence advocates in favor of its use as choice organism in several areas of research with the prospect of extrapolating findings to other vertebrates and humans (Briggs, 2002; Parng, Seng, Semino, & McGrath, 2002; Powers, 1989; Vascotto, Beckham, & Kelly, 1997).

In the later years, zebrafish was also proved valuable in drug screening and toxicology assays due to the marked absorption and internal distribution of substances presented on its tank water (reviewed in Kari, Rodeck, & Dicker, 2007; Parng et al., 2002). Since

its first employment, emphasis was given to characterize molecules within the nervous system, a difficult task to undertake in mammals (Key & Devine, 2003). The continuously growing knowledge and available mutants with phenotypes that relate to human brain diseases gave support to its use as model organism for other areas such as aging (Gerhard, 2007; Gerhard & Cheng, 2002), neurological diseases (Guo, 2004), drug addiction (Ninkovic & Bally-Cuif, 2006), and behavior studies (Fetcho & Liu, 1998; Guo, 2004; Horner, Longo, & Bitterman, 1961; Miklosi & Andrew, 2006; Salas et al., 2006).

In order to explore zebrafish's potential contribution to the characterization of the molecular machinery underlying learning and memory, consistent and straightforward paradigms are necessary. Several efforts to develop learning paradigms that would enable characterization of fundamental processes of cognitive performance in zebrafish were made, and benefited from previous work on behavior of other teleosts, especially goldfish. It has been shown that adult zebrafish can learn the association between an unconditioned and conditioned aversive stimuli of different natures (Arthur & Levin, 2001; Hall & Suboski, 1995; Moreira-Santos, Donato, Lopes, & Ribeiro, 2008; Pather & Gerlai, 2009; Pradel, Schachner, & Schmidt, 1999; Pradel, Schmidt, & Schachner, 2000; Serra, Medalha, & Mattioli, 1999; Xu, Scott-Scheiern, Kempker, & Simons, 2007), visual discrimination (Colwill, Raymond, Ferreira, & Escudero, 2005; Darland & Dowling, 2001; Hall & Suboski, 1995), spatial alternation (Williams, White, & Messer, 2002), and

\* Corresponding author. Address: Av Ipiranga, 6681 predio 12. Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil. Fax: +55 51 33203612.

E-mail address: [monica.vianna@puccrs.br](mailto:monica.vianna@puccrs.br) (M.R.M. Vianna).

both appetitive (Bilotta, Risner, Davis, & Haggbloom, 2005; Cofiel & Mattioli, 2009; Risner, Lemerise, Vukmanic, & Moore, 2006; Williams et al., 2002) and olfactory conditioning (Braubach, Wood, Gadbois, Fine, & Croll, 2009), among others types of memory. The effects of physiological active or pharmacologically modulated signaling pathways have been correlated to the maintenance of the conditioned response in several contexts, demonstrating the value of pharmacological manipulation in addition to genetic approaches to elucidate memory mechanisms (Darland & Dowling, 2001; Ed-dins, Petro, Williams, Cerutti, & Levin, 2009; Levin, Limpuangthip, Rachakonda, & Peterson, 2006; Rawashdeh, de Borsetti, Roman, & Cahill, 2007; Swain, Sigstad, & Scalzo, 2004). Since the behavioral tasks currently available involve long training sessions frequently along multiple days and are based on shuttle box or active-avoidance protocols, a simple learning protocol similar to those used in passive inhibitory avoidance and other rapidly acquired fear-conditioning protocols is necessary.

Here we present a rapid and effective learning protocol based on a single-trial inhibitory avoidance task to zebrafish. In a simple apparatus animals learn to avoid swimming from a white into a dark compartment in order to circumvent an electric shock during a training session that lasts less than 2 min. The resulting memory is robust and long-lasting. We also demonstrate the effect of the glutamatergic NMDA-receptor antagonism on memory formation, revealing a conserved memory mechanism and the task potential to evaluate the effect of pharmacological treatments given on the tank water.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and maintenance

Zebrafish (*D. rerio*) were obtained from a local pet store (Delphis, Porto Alegre, Brazil) and acclimatized for at least two weeks before the behavioral experiments. Adult animals (around 3 cm long) were kept in 50 L tanks with controlled quality water at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  and up to a density of five animals per liter (Westerfield, 2007). Animals were kept at a day/night cycle of 12:12 h and fed twice daily with commercial flakes and supplemented with live brine shrimp. Male and female individuals were used irrespective of their gender and not tagged for the duration of the experiments. Groups consisted of 11 or 12 animals each and different animals were used on each experiment.

All protocols were reviewed and approved by the Institutional Animal Care Committee (CEUA–PUCRS) and followed Brazilian legislation, the guidelines of the Brazilian Collegium of Animal Experimentation (COBEA) and the Canadian Council for Animal Care (CCAC) guide on the care and use of fish in research, teaching and testing.

At least one week prior to training, animals were transferred to 25 L temporary housing tanks in the task room to minimize further changes in context during the experiment duration. The housing tank mimicked the conditions mentioned above and had a glass partition that allowed manipulated and non-manipulated fish to be maintained separated during each experimental session and yet allowed animals to be maintained among its original group mates during the investigation. This strategy was adopted to minimize stress of animals due to isolation and its eventual impacts on the behavioral responses. Feeding was not interrupted during the experimentation and all sessions were performed at morning. On each session animals were gently captured from the temporary housing tank using a 6 cm wide fine nylon mesh fish net.

### 2.2. Inhibitory avoidance apparatus

An 18 cm L  $\times$  9 cm W  $\times$  7 cm H glass tank (adapted from Rawashdeh et al., 2007) divided in two equally sized compartments,

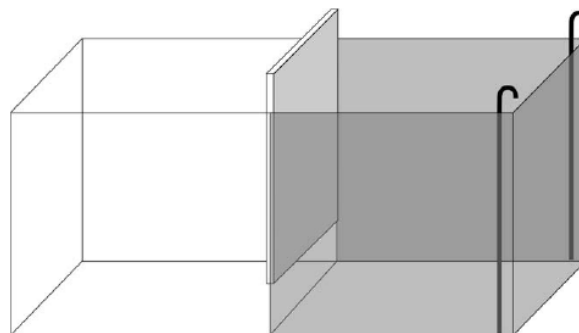
designated hereon as dark and white, by a sliding guillotine-type partition (9 cm  $\times$  7 cm) was used (Fig. 1). Compartments were defined by opaque plastic self-adhesive films in black or white colors externally covering walls, floor and the corresponding sides of the partition. The tank water level was 3 cm and the partition raised 1 cm above the tank floor to allow zebrafish to swim freely from one side of the tank to the other. The tank water used was the same from the housing tanks. Two electrodes extending through the wall height and placed on each far side of the opposing side walls of the dark compartment were attached to an 8 V stimulator and administered a final  $3 \pm 0.2\text{ V}$  AC shock (intensity measured between electrodes and the center of the dark compartment) when manually activated.

### 2.3. Apparatus recognition

To evaluate animals' ability to distinguish between the inhibitory avoidance tank white and dark compartments and further explore animals' innate behavior to set up the conditioning protocol, we tested animals' exploratory behavior and preference between compartments by allowing them to freely explore the inhibitory avoidance apparatus for 5 min. The electrodes used on the inhibitory avoidance protocol were removed from the tank dark compartment. Twelve animals were individually placed at the white side of the apparatus and allowed to swim freely through the 1 cm high 9 cm wide aperture between compartments. The time spent on each compartment and the numbers of crossings back and forth were recorded independently during the first and last 2.5 periods of the 5 min session to allow further comparisons. The latency to first enter the dark compartment was also measured.

### 2.4. Inhibitory avoidance protocol

Zebrafish were trained and tested individually in the inhibitory avoidance apparatus. Animals were gently placed in the white side of the task tank while the partition between compartments was closed. After 1 min of familiarization with the new environment the partition was raised, allowing fish to cross to the dark side of the tank through the 1 cm high opening. On training session, when animals entered the dark side with their entire body the sliding partition was closed and a pulsed electric shock administered for 5 s. Fish were then removed from the apparatus and placed in the dedicated compartment of the temporary housing tank. Ani-



**Fig. 1.** Schematic representation of the 18 cm L  $\times$  9 cm W  $\times$  7 cm H inhibitory avoidance glass tank with dark and white compartments separated by a sliding partition. Compartments were defined by plastic self-adhesive film in black or white colors externally covering walls, floor and the corresponding sides of the partition. When the apparatus was used as an inhibitory avoidance task two wire electrodes extending through each opposing side wall on the dark compartment were attached to a manually operated electric stimulator.



imals were tested 24 h after training. The test session repeated the training protocol except that no shock was administered and animals immediately removed from the dark compartment. The latency to completely enter the dark compartment was measured on both sessions and the test latencies used as an index of retention.

Animals were monitored after training to evaluate potential negative effects of the electric shock. As expected based on previous work that used more intense and repeated stimulation, the shock did not cause any perceivable damage, and no alteration on swimming performance, body orientation, external injury or increased susceptibility to diseases was observed in the following days.

To ensure that test latencies indicated animals retention of the learned association between the aversive stimulus (shock) and the dark environment entry, an additional experiment was performed in which animals were submitted to the same procedures described for inhibitory avoidance but did not receive electric shock while remained 5 s in the dark environment during the corresponding training.

### 2.5. Pharmacological treatment

To confirm that learning on the zebrafish inhibitory avoidance task involved evolutionary conserved mechanisms and to demonstrate the task potential use in pharmacological studies of memory mechanisms we investigated the effect of dizolcipine, a NMDA-receptor non-competitive antagonist, on memory formation. Twenty four animals were trained on the inhibitory avoidance task. Immediately after the training session animals were assigned to one of two groups, control or MK-801, and individually placed in 12 cm L × 8.5 cm W × 13 cm H treatment glass tanks containing 300 ml of either tank water or 20 μM (+)MK-801 hydrogen maleate (Sigma–Aldrich, Brazil) dissolved in tank water during 15 min. After treatment animals returned to the housing tanks and were kept separated according to their group until inhibitory avoidance test session on the next day. The 20 μM MK-801 dose was chosen based on previous work by Swain et al. (2004) showing no compromising effect on swimming performance after a 1 h treatment regimen with this dose.

### 2.6. Data analysis

Data were analyzed parametrically using SPSS software and are shown as mean ± SEM. The time spent on each compartment and the number of crossings during each half period of the 5 min tank recognition session was compared by paired *t*-test. Inhibitory avoidance training and test latencies for each group were compared using paired *t*-test and comparisons between groups were performed using independent *t*-test. In all comparisons,  $p \leq 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

Data here presented was analyzed parametrically as no ceiling was imposed in neither training nor test sessions. For ease or when memory facilitatory factors are being studied, an upper limit can be attributed to session latencies and non-parametrical statistics used.

## 3. Results

### 3.1. Apparatus recognition and dark compartment preference

Before establishing the inhibitory avoidance protocol we evaluated animals' ability to recognize the apparatus environment and distinguish between the dark and white compartments under neutral conditions. As shown in Fig. 2, when allowed to freely survey

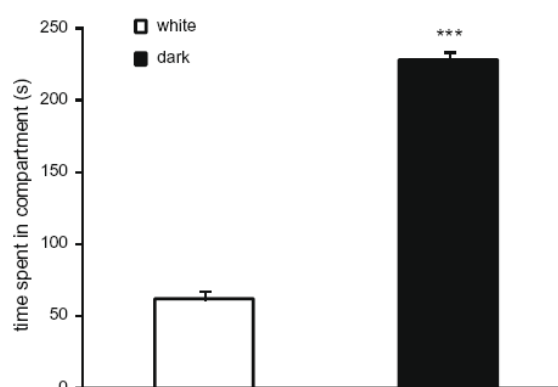


Fig. 2. Zebrafish preference for the dark compartment. Animals ( $n = 12$ ) were placed on the white compartment of the task apparatus with the sliding partition raised 1 cm high from the floor and allowed to freely explore the tank for 5 min. Columns indicate mean time (in seconds) spent in each compartment + SEM during the 5 min session. \*\*\* indicates statistical differences between time spent on white and dark compartments ( $p < 0.0001$ ).

the apparatus for 5 min, animals demonstrated a marked preference for the dark side, spending significantly more time in the dark compartment than in the white one through the session ( $p < 0.0001$ ). The preference was also statistically significant when each 2.5 min period was evaluated independently. These findings are in accordance to previous demonstrations of zebrafish preference for dark over brighter or illuminated environments (Serra et al., 1999).

Animals learned to recognize the apparatus environment, and under neutral conditions habituated as suggested by the decrease in exploratory activity. When the number of crossings from the initial 2.5 min period ( $19.18 \pm 2.01$ ) was compared to that of the final 2.5 min ( $13.18 \pm 1.55$ ) a significant decrease was noted ( $p < 0.01$ ). Interestingly, although animals explored progressively less over time, the dark side preference remained constant, with a steady prevalence of time spent in the dark compartment.

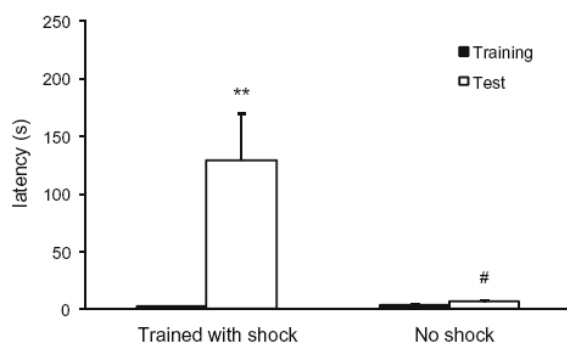
Importantly, no difficulty in crossing the 1 cm high aperture connecting compartments was observed, in accordance to previous studies using similar strategies and even smaller underwater openings (Xu et al., 2007).

### 3.2. Long-term memory formation after a single-trial training on inhibitory avoidance

After accessing animals' ability to explore the apparatus and the innate preference for the dark compartment, the inhibitory avoidance protocol was established. A new group of animals was assigned into two different experimental groups, one that was submitted to training and test sessions as described in Section 2.4 and therefore received an electric shock after crossing from white to dark compartment on training session, and an additional control group, that equivalently crossed to the dark compartment but did not receive a shock during the corresponding training session.

Data from animals that received electric shock during training in a contingent association to the dark compartment entry are summarized in Fig. 3 first pair of columns. After a single-trial learning session (training) animals significantly increased their latency to enter the dark compartment (test) ( $p < 0.01$ ), indicating memory retention when tested 24 h later.

Animals that were similarly manipulated but did not receive electric shock showed no increase in latency to enter the dark compartment on test session as also shown in Fig. 3. Training and test latencies were not statistically different and remained equivalently



**Fig. 3.** Comparison of memory latencies to enter the dark compartment for animals trained on the inhibitory avoidance and those similarly manipulated but without shock. Columns show mean latencies + SEM to cross from white to dark compartment (in seconds) in training and test sessions for animals submitted to training with shock ( $n = 12$ ) or submitted to equivalent manipulation but with no shock ( $n = 11$ ) on training day. \*\* indicates statistically significant difference between latencies on training and test sessions from animals trained with shock ( $p < 0.01$ ). # indicates statistically significant difference between test sessions of each group ( $p < 0.01$ ).

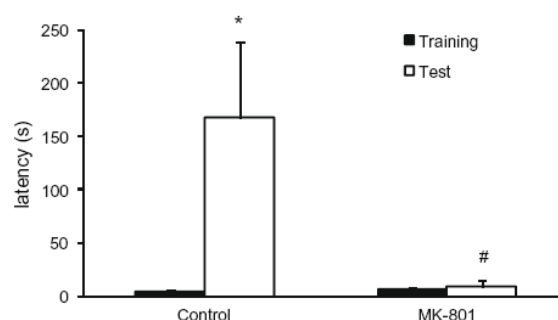
low for this group. Additionally, when test scores from animals from groups trained with and without shock were compared, a significant difference was found ( $p < 0.01$ ). That rules out the contribution of unspecific factors related to animals' manipulation or spontaneous tendencies that could contribute to the increased latencies seen on animals trained with electric shock. Additionally, training latencies for both groups were equivalent to those of the first crossing from white to dark compartment in the task recognition session.

### 3.3. The NMDA-receptor antagonist MK-801 prevented memory consolidation when given immediately after training

Memory formation has been shown to depend on highly conserved synaptic molecular mechanisms in a multitude of species (Barco, Bailey, & Kandel, 2006). Accordingly, in vertebrates it is known to involve evolutionarily related neuroanatomical areas in which those events take place (Wullimann & Mueller, 2004). Therefore, in addition to the protocol effectiveness in eliciting memory retention, an important demonstration to validate the task was to prove memory's sensibility to agents known to block a conserved mechanisms underlying memory formation.

Glutamatergic NMDA-receptor (NMDAR) activation is considered a hallmark triggering event for the synaptic plasticity associated with memory formation (reviewed in Castellano, Cestari, & Ciamei, 2001). In teleost fish the telencephalic formation is considered equivalent in function to the mammals' hippocampus, and presents significant amounts of NMDAR (Barnes & Henley, 1994; Bottai, Dunn, Ellis & Maller, 1997; Wullimann & Mueller, 2004). In zebrafish, long-term potentiation (LTP) in the telencephalon has been shown to depend on glutamatergic transmission and blocked by pharmacological inhibition of NMDAR (Nam, Kim, & Lee, 2004).

As shown in Fig. 4, the immediate posttraining treatment with the NMDAR non-competitive antagonist MK-801 for 15 min in the tank water prevented memory formation. Whereas non-treated control group showed a significant retention on test session, increasing latencies to enter the dark compartment when training and test sessions were compared ( $p < 0.05$ ), animals treated with MK-801 had equivalent training and test scores ( $p = 0.66$ ). Additionally, test retention were significantly different ( $p < 0.01$ ) between control and MK-801 treated animals.



**Fig. 4.** The NMDA-receptor antagonist MK-801 prevents memory formation when given immediately after a one-trial avoidance training session. Immediately after training with shock on the inhibitory avoidance task animals were treated with either tank water (control) or 20  $\mu\text{M}$  (+)MK-801 hydrogen maleate dissolved in tank water during 15 min. Columns indicate animals' mean latencies + SEM to cross from white to dark compartment (in seconds) in training and test sessions for both control and MK-801 treated groups ( $n = 12$  per group). \* indicates statistically significant difference between latencies on training and test sessions for control group animals ( $p < 0.05$ ). # indicates statistically significant difference between test sessions of each group ( $p < 0.05$ ).

We found no suggestion of MK-801 unspecific side effects on behavioral parameters that could account to the memory deficit observed, including swimming activity and orientation. This is in accordance to the available literature, where an MK-801 deleterious effect on swimming activity was only observed on much longer treatment regimens. Swain et al. (2004) exposed zebrafish to varying doses of MK-801 for 1 h during four consecutive days and found a negative effect on swim bladder function only at 200  $\mu\text{M}$ . Additionally, MK-801 has been shown to alter sensorimotor functions and cause state dependency in rodents (Jackson, Koek, & Colpaert, 1992; Marquis, Paquette, Gussio, & Moreton, 1989; Mele et al., 1996) and those effects are excluded by post-training treatment.

## 4. Discussion

Although different paradigms are necessary to characterize the myriad of behavioral responses and their underlying neurobiological mechanisms, decades of learning and memory studies in rodents and other model organisms have proved that simple learning tasks based on associative conditioning of aversive stimulus elicit robust and stable memory traces are very useful to study evolutionary conserved memory mechanisms (Bitterman & Schoel, 1970; McGaugh, 2000). The behavioral tasks aiming to evaluate learning and memory mechanisms in zebrafish currently available involve long training sessions frequently along multiple days and are based on shuttle box or active-avoidance protocols, preventing a detailed analysis of cellular and molecular time-dependent processes involved in memory acquisition and consolidation. While active-avoidance and shuttle box protocols contribute importantly to the characterization of neuroanatomical memory substrates, its complexity and time consuming training sessions with numerous successive trials and electric shocks (several of them distributed along different days) make them less attractive to the dissection of time-dependent memory mechanisms.

This is the first demonstration of a one-trial passive avoidance task protocol to teleost fish comparable to that used in rodents and may represent a valuable tool to characterize different processes affecting memory in zebrafish and be easily adapted to other fish species. The rapid acquisition period is valuable when studying mechanisms of memory formation and represents an additional advantage in relation to previously proposed memory

tasks for zebrafish. Additionally, retention scores here presented are based on individuals' raw data and not on indirect scores as arbitrary criteria and percentage of correct responses. The protocol design also ensures all animals are equally stimulated during training, receiving a shock of constant duration and intensity, leaving only individuals' variability and the treatments in use as accountable factors.

Especially when testing pharmacological agents effects on memory formation, it is crucial to know the exact moment of initiation of those biological events which result in memory establishment and therefore to know when to administer a specific treatment (McGaugh & Izquierdo, 2000). Zebrafish's ability to rapidly and efficiently absorb small molecules in water represents a major advantage for rapid and noninvasive behavioral screenings when compared to other model organisms, especially mammals. The MK-801 efficiency in blocking memory formation when given immediately after training reinforces this view.

Pharmacological studies of memory have demonstrated NMDAR blockage negative effects on memory formation when given peripherally or intracranially in a myriad of memory tasks and to be effective when administered before or shortly after the learning session (Riedel, Platt, & Micheau, 2003). Our results are in accordance to previous studies that demonstrated MK-801 effectiveness in preventing memory formation when given after training in similar inhibitory avoidance tasks in chicks (Burchuladze & Rose, 1992; Freeman & Rose, 1995), rats (Liang, Lin, & Tyan, 1993; Packard & Theater, 1997) and mice (Castellano, Cestari, Ciamei, & Pavone, 1999; Cestari & Castellano, 1997; Mele et al., 1996). Other NMDAR antagonists given after training have also been shown to block inhibitory avoidance memory formation when administered on specific brain structures or intraventricularly (Ferreira et al., 1992; Jerusalinsky et al., 1992; Liang et al., 1993; Quevedo et al., 1997). Memory for other tasks was also sensitive to NMDA blockage after training (de Lima, Laranja, Bromberg, Roesler, & Schröder, 2005; Quevedo et al., 1997; Rickard, Poot, Gibbs & Ng, 1994; Teather, Packard, & Bazan, 2001). Several authors, however, failed to demonstrate negative effects of NMDAR antagonists on memory retention when given after training in a significant number of species, including goldfish (Davis & Klinger, 1994; Gómez, Vargas, Portavella, & López, 2006; Xu, Boshoven, Lombardo, & Spranger, 1998). The lack of effect of NMDAR antagonism is generally seen after longer training protocols typical of active or shuttle avoidance tasks and assumed to result from NMDAR activation no longer being effectively blocked by pharmacological agents. NMDARs are critical during the initiation phase of memory formation but play no further role once the plastic modifications underlying learning had started (Routtenberg, 2001). That has been suggested to explain discrepancies between studies using shuttle avoidance in contrast to passive avoidance in rats treated with NMDAR blockers by Roesler, Kuyven, Krueel, Quevedo, and Ferreira (1998) and could also account to the ineffectiveness of MK-801 in the study by Xu et al. (2007) on active-avoidance on zebrafish, since both authors used 30-trial training protocols. In that context our findings are also easily reconciled with previous demonstrations of NMDAR antagonists inefficiency in blocking memory formation after multiple-trial training sessions in goldfish (Gómez et al., 2006; Xu et al. 1998, 2001; Davis & Klinger, 1994).

Results here presented suggest that the zebrafish inhibitory avoidance task is based on conserved mechanisms and may help dissecting vertebrates' time-dependent events involved in memory formation. Combined with the expanding molecular information available for zebrafish it may help the identification of new components of the cellular machinery related to memory formation, retrieval and extinction.

## Acknowledgments

This work was supported by CNPq (567483/2008-8, 504508/2007-5, 476316/2006-5 and 312137/2006-0), FAPERGS and PUCRS.

## References

- Arthur, D., & Levin, E. D. (2001). Spatial and non-spatial visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Animal Cognition*, 4, 125–131.
- Barco, A., Bailey, C. H., & Kandel, E. R. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *Journal of Neurochemistry*, 97, 1520–1533.
- Barnes, J. M., & Henley, J. M. (1994). Quantitative analysis of the distributions of glutamatergic ligand binding sites in goldfish brain. *Brain Research*, 637, 323–327.
- Bilotta, J., Risner, M. L., Davis, E. C., & Haggblom, S. J. (2005). Assessing appetitive choice discrimination learning in zebrafish. *Zebrafish*, 2, 259–268.
- Bitterman, M. E., & Schoel, W. M. (1970). Instrumental learning in animals: Parameters of reinforcement. *Annual Review of Psychology*, 21, 367–436.
- Bottai, D., Dunn, R. J., Ellis, W., & Maler, L. (1997). N-methyl-D-aspartate receptor 1 mRNA distribution in the central nervous system of the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *Journal of Comparative Neurology*, 389, 65–80.
- Braubach, O. R., Wood, H. D., Gadbois, S., Fine, A., & Croll, R. P. (2009). Olfactory conditioning in the zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 198, 190–198.
- Briggs, J. P. (2002). The Zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282, 3–9.
- Burchuladze, R., & Rose, S. P. R. (1992). Memory formation in day old chicks requires NMDA but not non-NMDA glutamate receptors. *European Journal of Neuroscience*, 4, 533–538.
- Castellano, C., Cestari, V., & Ciamei, A. (2001). NMDA receptors and learning and memory processes. *Current Drug Targets*, 2, 273–283.
- Castellano, C., Cestari, V., Ciamei, A., & Pavone, F. (1999). MK-801-induced disruptions of one-trial inhibitory avoidance are potentiated by stress and reversed by naltrexone. *Neurobiology of Learning and Memory*, 72, 215–229.
- Cestari, V., & Castellano, C. (1997). MK-801 potentiates morphine-induced impairment of memory consolidation in mice: Involvement of dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berlin)*, 133, 1–6.
- Cofiel, L. P., & Mattioli, R. (2009). L-histidine enhances learning in stressed zebrafish. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42, 128–134.
- Colwill, R. M., Raymond, M. P., Ferreira, L., & Escudero, H. (2005). Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Processes*, 70, 19–31.
- Darland, T., & Dowling, J. E. (2001). Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 11691–11696.
- Davis, R. E., & Klinger, P. D. (1994). NMDA receptor antagonist MK-801 blocks learning of conditioned stimulus-unconditioned stimulus contiguity but not fear of conditioned stimulus in goldfish (*Carassius auratus* L.). *Behavioral Neuroscience*, 108(93), 5–940.
- de Lima, M. N., Laranja, D. C., Bromberg, E., Roesler, R., & Schröder, N. (2005). Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 156, 139–143.
- Eddins, D., Petro, A., Williams, P., Cerutti, D. T., & Levin, E. D. (2009). Nicotine effects on learning in zebrafish: The role of dopaminergic systems. *Psychopharmacology*, 202, 103–109.
- Ferreira, M. B., Wolfman, C., Walz, R., Da Silva, R. C., Zanatta, M. S., Medina, J. H., et al. (1992). NMDA-receptor-dependent, muscimol-sensitive role of the entorhinal cortex in post-training memory processing. *Behavioural Pharmacology*, 3, 387–391.
- Fetcho, J. R., & Liu, K. S. (1998). Zebrafish as a model system for studying neuronal circuits and behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 860, 333–345.
- Freeman, F. M., & Rose, S. P. (1995). MK-801 blockade of Fos and Jun expression following passive avoidance training in the chick. *The European Journal of Neuroscience*, 7, 563–569.
- Gerhard, G. S., & Cheng, K. C. (2002). A call to fins! Zebrafish as a gerontological model. *Aging Cell*, 1, 104–111.
- Gerhard, G. S. (2007). Small laboratory fish as models for aging research. *Ageing Research Reviews*, 6, 64–72.
- Gómez, Y., Vargas, J. P., Portavella, M., & López, J. C. (2006). Spatial learning and goldfish telencephalon NMDA receptors. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85, 252–262.
- Guo, S. (2004). Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: What can we learn from zebrafish? *Genes, Brain and Behavior*, 3, 63–74.
- Hall, D., & Suboski, M. D. (1995). Visual and olfactory stimuli in learned release of alarm reactions by zebra danio fish (*Brachydanio rerio*). *Neurobiology of Learning and Memory*, 63, 229–240.
- Horner, J. L., Longo, N., & Bitterman, M. E. (1961). A shuttle box for fish and a control circuit of general applicability. *American Journal of Psychology*, 74, 114–120.
- Jackson, A., Koek, W., & Colpaert, F. C. (1992). NMDA antagonists make learning and recall state-dependent. *Behavioural Pharmacology*, 3, 415–421.
- Jerusalinsky, D., Ferreira, M. B., Walz, R., Da Silva, R. C., Bianchin, M., Ruschel, A. C., et al. (1992). Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor

## CAPÍTULO 3

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A capacidade do nosso cérebro de processar e reter informações é incrível. Sabemos que as experiências sensoriais e emocionais vivenciadas por nós deixam traços duradouros em nosso sistema nervoso central - as memórias. E o entendimento de como estas memórias são formadas, armazenadas e recuperadas no cérebro é de grande relevância biológica com relação às inúmeras patologias dos sistema nervoso em humanos e um passo essencial para a compreensão de nós mesmos. Apesar dos avanços nas últimas décadas e da identificação de inúmeras regiões específicas do cérebro para o processamento da memória, bem como dos mecanismos moleculares importantes para o aprendizado (McGaugh, 2000), segue a busca pela elucidação dos mecanismos responsáveis por sua manutenção e funcionamento.

O *zebrafish* recentemente tem ganhado destaque no meio científico e demonstra grande potencial para estudos de aprendizado e memória uma vez que permite a identificação de genes e seus produtos envolvidos com os processos cognitivos de maneira fácil, barata e eficiente (GUO, 2004; SALAS et al., 2006; XU et al., 2007; AL-IMARI; GERLAI, 2008).

Baseado nas evidências de que a formação de novas memórias depende de mecanismos sinápticos moleculares altamente conservados evolutivamente (BARCO, BAILEY, & KANDEL, 2006) e que a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA é o evento fundamental para a plasticidade sináptica associada à formação de memórias (revisado em CASTELLANO, CESTARI & CIAMEI, 2001) torna-se válida a demonstração destes mecanismos no aprendizado em *zebrafish*. Em busca de um paradigma comportamental confiável e de simples aplicação para o *zebrafish* em que os mecanismos da formação de memórias pudessem ser avaliados, neste estudo desenvolvemos um novo protocolo de esquiva inibitória.

Os resultados apresentados no capítulo 2 tiveram como objetivo o desenvolvimento e a validação da tarefa de esquiva inibitória de apenas um treino para avaliação de memória em *zebrafish*. Os resultados apresentados demonstram que a tarefa de esquiva inibitória desenvolvida para *zebrafish* é baseada em mecanismos conservados em que o aprendizado, e resultante memória, são dependentes de sinalização glutamatérgica, assim como já evidenciado para outros vertebrados. É uma tarefa rápida, simples e que resulta em um aprendizado robusto, sólido e persistente representando um instrumento valioso para se caracterizar diferentes processos que afetam o comportamento no *zebrafish*, bem como permitir a dissecação dos eventos tempos-dependentes da formação de memórias de vertebrados. Combinado com a crescente informação molecular disponível para o *zebrafish* esta tarefa pode auxiliar na identificação dos componentes da maquinaria celular relacionados

com a formação, reaquisição e extinção de memórias bem como nos mecanismos de patologias do sistema nervoso.

## REFERÊNCIAS

ABROUS, D. N.; KOEHL, M.; LE MOAL, M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. **Physiological Reviews**, v. 85, p.523–569, 2005.

ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends in Neurosciences**, v. 28, n.1, p. 51-56, 2005.

AL-IMARI, L.; GERLAI, R. Sight of conspecifics as reward in associative learning in Zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 4 p., 2008. Disponível em: <<http://www.elesevier.com/locate/bbr>>. Acesso em: 12 jul. 2008.

ANDERSEN, P.; SOLENG, A. F. Long-term potentiation and spatial training are both associated with the generation of new excitatory synapses. **Brain Research Reviews**, v. 26, n. 2/3, p. 353-359, 1998.

BAILEY, C. H.; BARTSCH, D.; KANDEL, E. Toward a molecular definition of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 13445-13452, 1996.

BAILEY C.H.; KANDEL, E.R.; SI, K. The persistence of long-term memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth. **Neuron**, v. 44, p. 49–57, 2004.

BEKINSCHTEIN, P. *et al.* Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, v. 53, p. 261–277, 2007.

BEST, J. D. *et al.* Non-associative learning in larval zebrafish. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 5, p. 1206-15, 2008.

BILOTTA, J. *et al.* Assessing appetitive choice discrimination learning in zebrafish. **Zebrafish**, v. 2, n. 4. p. 259-68, 2005.

BLISS, T. V. P.; LOMO, T. Long-lasting Potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of Physiology**, v. 232, p. 331-356, 1973.

BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, p. 31-39, 1993.

BOURNE, H.R.; NICOLL, R.. Molecular machines integrate coincident synaptic signals. **Cell**, v. 72, p. 65-75, 1993.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; DAVIS, S.; LAROCHE, S. Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. **The Neuroscientist**, v.13, p. 492, 2007.

CAMMAROTA, M. *et al.* Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Molecular Brain Research**, v.76, p. 36-46, 2000.

CASTELLANO, C.; CESTARI, V.; CIAMEI, A.; PAVONE, F.. MK-801-induced disruptions of one-trial inhibitory avoidance are potentiated by stress and reversed by naltrexone. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 72, p. 215–229, 1999.

COLWILL, R. M. *et al.* Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Processes**, v. 70, p. 19–31, 2005.

DARLAND, T.; DOWLING, J. E. Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. **PNAS**, v. 98, n. 20, p. 11691–11696, 2001.

DAVIS, S.; BUTCHER, S. P.; MORRIS, R. G.. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. **Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 21-34, 1992.



DE CASTRO, M.R., *et al.* Behavioral and neurotoxic effects of arsenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei: Cyprinidae). *Comparative and Biochemistry and Physiology. C Toxicology and Pharmacology*, v.50, p. 337-42, 2009.

DINGLEDINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. F.. The glutamate receptorion channels. **Pharmacological Reviews**, v. 51, p. 7-61, 1999.

DUDAI, Y. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12 p. 211–216, 2002.

DUNNING, J.; DURING, M. J.. Molecular mechanisms of learning and memory. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 5, p.1-11, 2003.

EICHENBAUM, H. Is the rodent hippocampus just for 'place'?. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, p.187-195, 1996.

EICHENBAUM, H. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. **Behavioural Brain Research**, v.103, p. 123-133, 1999.

FAGANELLO, F.R.; MATTIOLI, R. Chlorpheniramine facilitates inhibitory avoidance in teleosts submitted to telencephalic ablation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v 41, p. 398-402, 2008.

FUSTER, J. M. Distributed memory for both short and long-term. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 70, p. 268-274, 1998.

GOLD, P. E. The use of inhibitory avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behavioral and Neural Biology**, v. 46, p. 87-98, 1986.

GOULD, E. *et al.* Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nature Neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 260-265, 1999.

GUO, S. Linking genes to rain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? **Genes, Brain and Behavior**, v. 3, p. 63:74, 2004.

IZQUIERDO, I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. **The FASEB Journal**, v. 8, p. 1139-1145, 1994.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.68, p. 285–316, 1997.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v.393, p. 635-636, 1998.

IZQUIERDO, I. *et al.* Separate mechanisms for short- and long term memory. **Behavioural Brain Research**, v.103, p. 1-11, 1999.

IZQUIERDO, I. *et al.* Short and long-term memory are differentially affected by metabolic inhibitors given into hippocampus and entorhinal cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 73, p. 141-149, 2000.

IZQUIERDO, I. *et al.* Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 9, p. 496-505, 2006.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030-1038, 2001.

KEE, N. *et al.* Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 355-362, 2007.

KEY, B.; DEVINE, C. A. Zebrafish as an experimental model: strategies for developmental and molecular neurobiology studies. **Methods in Cell Science**, v. 25, p. 1–6, 2003.

KIMMEL, C.B. *et al.* Stages of embryonic development of zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, p. 253-310, 1995.

LEUNER, B. *et al.* Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 34, p. 7477–7481, 2004.

LEVIN, E. D.; CHEN, E. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, p. 731–735, 2004.

LOPEZ, J. C. *et al.* Dissociation of place and cue learning by telencephalic ablation in goldfish. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, n. 4, p. 687-699, 2000.

MALENKA, R. C.; NICOLL, R. A. Long-term potentiation: a decade of progress? **Science**, v. 285, p. 1870-1874, 1999. - 38 -

MAREN, S.; BRAUDY, M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 63, p. 1-18, 1995.

MARKHAM, J. A.; GREENOUGH, W. T. Experience-driven brain plasticity: beyond the synapse. **Neuron Glia Biology**, v. 1, n.4, p. 351–363, 2004.

MARKOWITSCH, H. Varieties of memory: systems, structures, mechanisms of disturbance. **Neurology Psychiatry and Brain Research**, v. 5, p. 49-68, 1997.

McGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, v. 153, p. 1351-1358, 1966.

McGAUGH, J. L. Memory-a century of consolidation. **Science**, v.287, n. 5451, p. 248-51, 2000.

McGAUGH, J. L. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n.9, p. 456, 2002.

McGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends Pharmacological Sciences**, v.21, n.6, p.208-210, 2000.

MEDINA, J.H. *et al.* Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? **Behavioural Brain Research**, v. 192, p. 61–69, 2008.

MIKLOSI, A.; ANDREW, R. J. The zebrafish as a model for behavioral studies. **Zebrafish**, v. 3, n. 2, 2006.

MILLER, G. How are memories stored and retrieved? **Science**, v. 309, p. 92, 2005.

MING, G.; SONG, H. Adult Neurogenesis in the mammalian central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**. v.28, p. 223-250, 2005.

MURPHY, K. J.; REGAN, C. M. Contributions of cell adhesion molecules to altered synaptic weightings during memory consolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.70, n. 1-2, p.73-81, 1998.

NAM, R. H.; KIM, W.; LEE, C. J.. NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the telencephalon of the zebrafish. **Neuroscience Letters**, 370, p. 248–251, 2004.

PORTAVELLA, M. *et al.* The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. **Brain Research Bulletin**, v. 57, n. 3/4, p. 397–399, 2002.

PRADEL, G.; SCHACHNER, M.; SCHMIDT, R. Inhibition of memory consolidation by antibodies against cell adhesion molecules after active avoidance conditioning in zebrafish. **Journal of Neurobiology**, v. 39, 2, p. 197-206, 1999.

PRADEL, G.; SCHMIDT, R.; SCHACHNER, M. Involvement of L1.1 in memory consolidation after active avoidance conditioning in zebrafish. **Journal of Neurobiology**, v.43, n. 4, p. 389-403, 2000.

RADLEY, J. J. *et al.* Associative Pavlovian conditioning leads to an increase in spinophilin-immunoreactive dendritic spines in the lateral amygdala. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 876–884, 2006.

RAWASHDEH, O *et al.* Melatonin Suppresses Nighttime Memory Formation in zebrafish. **Science**, v. 318, p. 1144, 2007.

RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Introduction: molecular mechanisms of memory formation – from receptor activation to synaptic changes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 521-524, 1999.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J.. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavior Brain Research**, v. 140, p. 1–47, 2003.

SALAS, C. *et al.* Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. **Zebrafish**, v. 3, n. 2, p. 151-157, 2006.

SPENCE, R. *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 83, p. 13-34, 2000.

THOMPSON, R.F.; KIM, J. J. Memory systems in the brain and localization of a memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 13438–13444, 1996.

TROPEPE, V.; SILVE, H.L. Can zebrafish be used as a model to study the developmental causes of autism? **Genes, Brain Behaviour**, v.2, p. 268-281, 2003.

TSIEN, J. Z.; HUERTA, P. T.; TONEGAWA, S.. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. **Cell**, v. 87, p. 1327-1338, 1996.

VIANNA, M. R. *et al.* Intrahippocampal infusion of an inhibitor of protein kinase A separates short- from long-term memory. **Behavioural Pharmacology**, v. 10, p. 223-227, 1999.

VIANNA, M. R. *et al.* Differential role of hippocampal cAMP-dependent protein kinase in short and long-term memory. **Neurochemical Research**, v. 25, p. 621-626, 2000a;

VIANNA, M. R. *et al.* Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory. **Psychopharmacology**, v. 150, p. 77-84, 2000b.

VIANNA, M. R. *et al.* Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 12251-12254, 2001.

WAITES, C.L.; CRAIG, A. M.; GARNER, C.C. Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. **Annual Review in Neuroscience**, v. 28, p. 251-274, 2005.

WILLIAMS, F. E.; WHITE, D.; MESSER, W. S. A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish. **Behavioural Processes**, v. 58, n. 3, p. 125-132, 2002.

WULLIMANN, M. F.; MUELLER, T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. **The Journal of comparative neurology**, v. 475, n. 2, p. 143-62, 2004.

XU, X. *et al.* Active avoidance conditioning in zebrafish (*Danio rerio*). **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, n. 1, p. 72-7. 2007.

YU, L. *et al.* Cognitive aging in zebrafish. **PLoS ONE**, v.1, n. 1, p. 1-13, 2006.

ZON, L. I.; PETERSON, R.T. In vivo drug discovery in the zebrafish. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 35-44, 2005.

**ANEXO**

**COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO PELO COMITÊ DE ÉTICA  
PARA O USO DE ANIMAIS (CEUA) DA PUCRS**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS



Ofício 061/08-CEUA

Porto Alegre, 20 de agosto de 2008.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 08/00037, intitulado: **"Padronização de uma tarefa para avaliação de memória no peixe-zebra"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios do andamento do projeto devem ser entregues a este Comitê.

Solicitamos que nos próximos projetos, a folha de rosto seja entregue com a assinatura do Diretor da Faculdade.

Atenciosamente,

  
Profa. Dr. Anamaria Feijó  
Coordenadora do CEUA - PUCRS

Ilma. Sra.  
Prof. Dr. Monika Vianna  
Faculdade de Biociências

PUCRS

**Campus Central**

Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar sala 314- CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)