

ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

KARINA VIDARTE GASPARY

**MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO E LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS EM PEIXE-ZEBRA
(*DANIO RERIO*): INFLUÊNCIA DA SINALIZAÇÃO GLUTAMATÉRGICA E RESPOSTAS
ENDÓCRINAS**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Escola de Ciências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Memória de reconhecimento e localização de objetos em peixe-zebra (*Danio rerio*):
Influência da sinalização glutamatérgica e respostas endócrinas**

KARINA VIDARTE GASPARY

Orientadora: Profa. Dr. Carla Denise Bonan

PORTO ALEGRE, 2018

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Escola de Ciências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Memória de reconhecimento e localização de objetos em peixe-zebra (*Danio rerio*):
Influência da sinalização glutamatérgica e respostas endócrinas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular como requisito para obtenção do título de Mestre.

KARINA VIDARTE GASPARY

Orientadora: Profa. Dra. Carla Denise Bonan

PORTO ALEGRE, 2018

Ficha Catalográfica

G249m Gaspary, Karina Vidarte

Memória de reconhecimento e localização de objetos em peixe-zebra (*Danio rerio*) : Influência da sinalização glutamatérgica e respostas endócrinas / Karina Vidarte Gaspary . – 2018.

61 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Denise Bonan.

1. Cortisol. 2. Memória. 3. MK-801. 4. Reconhecimento de objetos. 5. Peixe-zebra. I. Bonan, Carla Denise. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecário responsável: Marcelo Votto Texeira CRB-10/1974

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Evelise Conceição Vidarte e Gelson da Conceição Gaspar, pelo amor, carinho e apoio incondicional. E toda minha família que me deu apoio e incentivo nas horas difíceis de desânimo e cansaço.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Carla Bonan por todo apoio, compreensão e confiança durante a elaboração deste trabalho e de grande parte de minha formação.

Ao meu colega Gustavo por toda a ajuda e conselhos durante realização deste trabalho.

Meus agradecimentos aos meus amigos e companheiros de laboratório que fizeram parte da minha formação sempre contribuindo com discussões e tornando essa experiência muito mais prazerosa.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

RESUMO

A memória permite que os animais possam adaptar e modificar seu comportamento diante de novas experiências. Uma série de fatores pode resultar num déficit de memória como: doenças neurodegenerativas, alterações decorrentes de intoxicações e uso de fármacos. O peixe-zebra vem sendo usado para modelar características comportamentais humanas complexas, como o aprendizado e memória. Este estudo tem como objetivo estabelecer um protocolo para avaliar tarefas de memória de reconhecimento de objetos ou de localização de objetos no peixe-zebra. Nós avaliamos a memória de reconhecimento de objeto novo e analisamos o tempo de exploração de objetos novos e familiares nas sessões de treino e teste. Houve uma preferência do animal em explorar o novo objeto em comparação com o objeto familiar (61% do tempo de exploração). Também avaliamos a tarefa de localização de objeto e medimos o tempo de exploração de cada objeto nos locais familiares e novos. Houve uma preferência do animal para explorar o objeto na localização nova em comparação com o objeto na localização familiar (63% do tempo de exploração). Também avaliamos o efeito do antagonista não competitivo do receptor NMDA MK-801 na memória de reconhecimento de objeto novo e na localização de objeto em peixe-zebra. Neste tratamento, o controle (somente água) e os animais tratados (MK-801 5 μ M) apresentaram uma preferência significativa na exploração do objeto familiar em comparação com o novo objeto (66 e 68% do tempo de exploração, respectivamente); no entanto, animais tratados com MK-801 10 μ M não mostraram diferenças no tempo de exploração dos objetos. Na tarefa de localização de objeto, os animais tratados com MK-801 5 ou 10 μ M não mostraram preferência significativa pelo objeto na localização familiar ou nova, enquanto que o grupo controle teve uma preferência maior em explorar o objeto na localização familiar (64% de tempo de exploração). Portanto, sugere-se que o MK-801 5 μ M prejudicou a formação da memória em uma tarefa de localização de objeto, o que está de acordo com estudos prévios, demonstrando o déficit cognitivo induzido pelo MK-801 em memórias aversivas ou espaciais. Considerando as diferentes respostas do grupo controle entre a tarefa original e no tratamento, avaliamos o impacto da habituação nos níveis de cortisol dos animais em três protocolos diferentes: 1) habituado ao aparato experimental por 3 dias (Condição 1 - C1) 2) habituado ao aparato experimental por 3 dias mais a exposição ao aquário de tratamento no quarto dia (Condição 2 - C2), 3) habituado na exposição ao aquário de tratamento e no aparato experimental por 3 dias e exposto ao aquário de tratamento novamente no quarto dia (Condição 3 - C3). Os resultados mostraram níveis mais elevados de cortisol em animais submetidos a condições C2 e C3 em comparação com animais submetidos a C1. Esses resultados demonstraram que os animais submetidos à exposição ao aquário de tratamento apresentam desempenho diferente nas tarefas de memória de reconhecimento de objetos e de localização do objeto devido ao estresse.

Portanto, essas tarefas são adequadas para avaliar a memória em condições fisiológicas e patológicas, mas seu uso é limitado em estudos farmacológicos devido à sensibilidade ao estresse causado pela manipulação.

Palavras-chave: cortisol; memória; MK-801; reconhecimento de objeto; peixe-zebra.

ABSTRACT

Memory and learning allow animals to adapt and modify their behavior towards new experiences. Some factors may result in memory deficits such as: neurodegenerative diseases, changes due to intoxication and the use of drugs. Zebrafish can be used to model complex human behavioral traits such as learning and memory. This study aims to establish a protocol for evaluating the object recognition memory or object location tasks in zebrafish. We evaluated novel object recognition memory and analyzed the exploration time of novel and familiar objects in the training and test sessions. There was a preference of the animal to explore the new object in comparison to the familiar object (61% of exploration time). We also evaluated the object location task and measured the exploration time of each object in the familiar and novel object locations. There was a preference of the animal to explore the object in the novel location in comparison to the object in the familiar location (63% of exploration time). We also evaluated the effect of the non-competitive NMDA receptor antagonist MK-801 on the object recognition and object location memory in zebrafish. In this regimen treatment, control (water only) and treated animals (5 μ M MK-801) presented a significant preference in exploring the familiar object in comparison to the new object (66 and 68% of exploration time, respectively); however, 10 μ M MK-801-treated animals did not show differences in the exploration time of the objects. In the object location task, the animals treated with the 5 or 10 μ M MK-801 did not show a significant preference for the familiar or novel location whereas the control group had a higher preference in exploring the object in the familiar location (64% of exploration time). Therefore, it is possible to suggest that 5 μ M MK-801 impaired the memory formation in an object location task, which is in agreement with previous studies demonstrating the cognitive deficit induced by MK-801 treatment in aversive and spatial memory. Considering the different responses of the control group between original task and in the regimen treatment, we evaluated the impact of habituation on cortisol levels of animals in three different protocols: 1) habituated at the experiment apparatus for 3 days (Condition 1 – C1), 2) habituated at the experiment apparatus for 3 days plus treatment tank exposure at fourth day (Condition 2 - C2),

3) habituated at the treatment tank exposure and experiment apparatus for 3 days and exposed to treatment tank again at fourth day (Condition 3 – C3). The results showed higher levels of cortisol in animals submitted to C2 and C3 conditions compared to animals submitted to C1. These results demonstrated that the animals submitted to treatment tank exposure have a different performance in object recognition and object location memory due to stress responses. Therefore, these tasks are prone to evaluate memory in physiological and pathological conditions, but its use is limited to perform pharmacological studies due to sensitivity to stress caused by manipulation.

Keywords: cortisol; memory; MK-801; object recognition; zebrafish.

SUMARIO

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Peixe-zebra	11
1.2 Memória de reconhecimento de objetos	13
1.2.1 Memória de reconhecimento de objeto novo	13
1.2.2 Memória de localização de objetos	15
1.3 Vias neuroquímicas relacionadas à memória	16
1.3.1 Sistema Glutamatérgico	16
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	19
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO	20
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
5. REFERÊNCIAS	53
6. ANEXO	60

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

1. INTRODUÇÃO

A memória trata-se de um processo amplo que inclui a aquisição, consolidação e a evocação do conhecimento adquirido. Isso permite que os animais possam adaptar e modificar seu comportamento diante de novas experiências através do aprendizado e memória (Kandel, 2001).

A memória pode ser classificada como de curto prazo ou de longo prazo, com base na duração de seu armazenamento. A memória de curto prazo é retida durante algumas horas após o aprendizado, durante o qual a informação permanece acessível. Esse tipo de memória é independente da síntese de novas proteínas e da expressão de RNA (Woldemichael et al., 2014). Enquanto que a memória de longo prazo é utilizada para armazenar, gerenciar e recuperar informações em períodos que variam desde vários dias até muitos anos (Moore et al., 2013; Rendeiro et al., 2009). Para estabelecer este processo, a síntese de proteínas e RNAm é necessária para estabilizar as alterações sinápticas (Costa-Mattioli e Sonenberg, 2008). A memória de longo prazo pode ser separada quanto ao seu conteúdo como declarativa ou explícita e procedural ou implícita (Squire, 1992; Markowitsch, 1997). A memória explícita envolve a capacidade de lembrar conscientemente de fatos e eventos ocorridos. A memória implícita envolve processos inconscientes que geralmente dependem da repetição de um procedimento, como por exemplo, aprender a andar de bicicleta (Squire, 1992; Markowitsch, 1997).

O aprendizado e a memória são processos complexos do cérebro que são dependentes de estruturas específicas do sistema nervoso central. Em particular, o hipocampo e amígdala são essenciais para o processamento de dados e armazenamento de informações, relacionadas às memórias declarativas ou explícitas (Markram et al., 2007). Diversos estudos mostram que esse processo ocorre principalmente no hipocampo de mamíferos (McGaugh, 2000; Izquierdo et al., 2006). Outras estruturas cerebrais e diferentes sistemas neurotransmissores podem desempenhar um papel importante, dependendo da natureza da memória a ser processada, como por exemplo o cerebelo para memórias procedurais ou implícitas (Izquierdo et al., 2006; Myskiw et al., 2010).

A impossibilidade de adquirir e/ou expressar informações é chamada de amnésia. A amnésia pode ser classificada em dois tipos. Amnésia retrógrada é quando há a perda de informações antes da lesão ou da intervenção que causou a amnésia. A amnésia anterógrada é quando ocorre a perda da capacidade de adquirir novas informações (Smith et al., 2013). Esse prejuízo pode tanto manifestar-se como sintoma de alguns casos clínicos, quanto caracterizar primariamente um quadro patológico (Pittenger, 2013). A amnésia pode ser causada por qualquer processo patológico, que resulte em dano ao funcionamento adequado para a aquisição, consolidação e evocação de informações, geralmente resultado de lesões em estruturas cerebrais envolvidas na memória, tais

como o hipocampo e a amígdala (McGaugh, 2002; Riedel et al., 1999; Roesler et al., 2002). Entretanto, uma série de outros fatores pode resultar em um déficit de memória como: hipoglicemia, traumatismos e tumores cerebrais, doenças neurodegenerativas (como a Doença de Alzheimer e demência senil), acidentes cerebrais vasculares, alterações decorrentes de intoxicações e o uso de fármacos como os benzodiazepínicos (Orzelska-Gorka et al., 2016; Lim e Alexander, 2009; Pike e Savage, 2008; Vakil, 2007). Os estudos em modelos animais permitem a investigação de mecanismos envolvidos na formação e processamento da memória (Febo e Foster, 2016). Dentre os diferentes tipos de memória, a memória associativa é avaliada em animais através da observação de alterações comportamentais após a administração de um estímulo em um ambiente controlado. Os modelos animais de aprendizado e memória permitem a análise do efeito de intervenções farmacológicas ou genéticas sobre sistemas bioquímicos específicos, possibilitando a avaliação do papel desses sistemas na memória (Kapczinski et al., 2000; More et al., 2016).

1.1 Peixe-zebra

O *Danio rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish* ou peixe-zebra, é um pequeno teleósteo de água doce proveniente do sudeste da Ásia, Índia e Nepal. Seus habitats naturais são pequenos riachos, lagoas, córregos e campos de arroz com pouco fluxo de água (Engeszer et al., 2007). O peixe-zebra tornou-se um modelo promissor para estudos em muitas áreas de pesquisa, tais como toxicologia, fisiologia, neurobiologia, farmacologia, envelhecimento, e diversas patologias, incluindo câncer, doenças musculares, degenerativas e imunológicas (Kristen et al., 2018; Fetcho e McLean, 2010), bem como para desenvolvimento de novos fármacos (Kuang et al., 2017). Esse fato se deve à facilidade de manutenção e manipulação em relação a outros modelos animais (como roedores), a uma complexidade típica de vertebrados que facilita a extrapolação de resultados nele obtidos em relação aos humanos de maneira mais direta do que aqueles obtidos em invertebrados (Gerlai, 2014) e aos genes deste teleósteo serem evolutivamente conservados e apresentarem um alto grau de similaridade com os genes humanos e de camundongo (Howe et al., 2013). Mesmo o sistema nervoso central (SNC) do peixe-zebra sendo mais simples do que o dos seres humanos, as maiores divisões do encéfalo (cérebro anterior, mesencéfalo e rombencéfalo) estão presentes e estudos têm demonstrado que o telencéfalo (com subdivisões homólogas ao hipocampo e a amígdala de mamíferos) é a área responsável pelo aprendizado e memória em peixes teleósteos (Portavella et al., 2002; Rodriguez et al., 2002). Além disso, muitos sistemas de neurotransmissão excitatórios e inibitórios foram mapeados no sistema nervoso do peixe-zebra, tais como sistemas dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico, purinérgico, histaminérgico, nitrérgico,

glutamatergico, glicinérgico e gabaérgico (Panula et al., 2010; Rico et al., 2011).

O eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI) em peixe-zebra controla os níveis de cortisol circulante, da mesma forma que o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em mamíferos. Este sistema de sinalização foi caracterizado no peixe-zebra em detalhes (Alderman e Bernier, 2009; Alsop e Vijayan, 2009). A ativação deste eixo se inicia no hipotálamo, que recebe entradas transmitidas a partir do sistema nervoso central e periférico. Sinais estressantes estimulam a secreção do hormônio de liberação de corticotrofina (CRH) e em resposta ao CRH, a pituitária libera o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea, que atinge região superior do rim de peixe (homólogo da glândula adrenal em mamíferos). Em seguida, o cortisol é secretado e se liga ao receptor de glicocorticóides (GR), um fator de transcrição nuclear. O GR regula a transcrição de genes relacionados ao metabolismo da glicose, ao sistema imune e ao comportamento (Bury e Sturm, 2007). Este sistema de sinalização se assemelha ao sistema neuroendócrino humano, tanto na complexidade quanto na utilização de cortisol (em oposição à corticosterona em roedores), reforçando a contribuição do peixe-zebra para estudos sobre a neurobiologia do estresse (Piato et al., 2011).

O peixe-zebra pode ser usado para modelar características comportamentais humanas complexas, como a capacidade de resposta de recompensa, aprendizado e memória, agressividade, ansiedade e sono (Norton e Bally-Cuif, 2010). Estudos também observaram a importância do comportamento inato e adquirido em modelos de agressividade, sociabilidade e sua preferência por ambientes claros ou escuros (Serra et al., 2000). Além dos diversos estudos nas áreas de biologia do desenvolvimento e neurociências em peixe-zebra, este modelo tem contribuído para diversas pesquisas em farmacologia comportamental (Norton e Bally-Cuif, 2010; Gerlai, 2014; Bailey et al., 2015). Várias tarefas descritas na literatura têm como alvo explicitamente os processos de formação da memória, como por exemplo, a memória em labirinto, que se baseia na discriminação espacial (Cognato et al., 2012; Braida et al., 2014b; Grossman et al., 2010). Diferentes tarefas de esquiiva inibitória já foram estabelecidas em peixe-zebra (Blank et al., 2009). Geralmente, a memória de esquiiva é inferida pela latência de entrada no compartimento anteriormente associado a um estímulo aversivo. Este tipo de esquiiva inibitória é frequentemente usado para caracterizar o aprendizado associativo e memória de curto e longo prazo, e no peixe-zebra tem sido utilizada para caracterizar os efeitos da exposição aos antipsicóticos (Seibt et al., 2011), escopolamina (Kim et al., 2010; Richetti et al., 2011), MK-801 (Ng et al., 2012; Seibt et al., 2011) e agonistas e antagonistas adenosinérgicos (Bortolotto et al., 2015).

1.2 Memória de reconhecimento de objetos

1.2.1 Memória de reconhecimento de objeto novo

Entre os testes utilizados para avaliar modelos de amnésia está a tarefa de reconhecimento de objeto novo (*novel object recognition* - NOR) (Ennaceur, 2010). Este tipo de teste avalia o comportamento do animal quando este é exposto a um novo objeto e a um objeto familiar. A tarefa de reconhecimento de objetos foi estudada pela primeira vez por Ennaceur e Delacour (1988), que concluíram que estes são ensaios comportamentais simples de memória que se baseiam principalmente no comportamento exploratório inato de roedores na ausência de estímulos aversivos ou de reforço. A tarefa de NOR tornou-se um modelo amplamente utilizado para a investigação sobre alterações de memória (Antunes e Biala, 2012). No entanto, ela pode ser usada para avaliar a memória, a atenção, ansiedade, e a preferência por novidade em roedores (Goulart et al., 2010; Silvers et al., 2007), sendo também usada para testar os efeitos de vários tratamentos farmacológicos e danos cerebrais (Goulart et al., 2010). A tarefa NOR é muito útil para estudar a memória de curto prazo e a memória de longo prazo, através da manipulação do intervalo de retenção, isto é, a quantidade de tempo entre o treino e o teste (Tagliabata et al., 2009). A maior vantagem conferida pelo teste é o fato que não requer motivação externa, recompensa ou punição, mas a habituação é necessária, e pode ser concluída num período relativamente curto de tempo (Silvers et al., 2007).

A tarefa NOR consiste em três fases: habituação, treino e teste. Na fase de habituação, o animal explora a área de teste na ausência de objetos. O animal é então removido e colocado em uma área de retenção. Durante o treino, o animal é recolocado na mesma área de teste, contendo dois objetos de formas idênticas durante alguns minutos. Após um intervalo de retenção ocorre o teste: o animal é devolvido para a área com dois objetos, um é idêntico ao apresentado anteriormente e o outro é um objeto novo (Ennaceur, 2010; Ennaceur e Delacour, 1988; Gaskin et al., 2010; Hammond et al., 2004; Tagliabata et al., 2009). O teste de reconhecimento foi inicialmente desenvolvido para roedores (Ennaceur e Delacour, 1988) e posteriormente adaptado para macacos (Malkova e Mishkin, 2003; Zola et al., 2000), cães (Calalahan et al., 2000) e gatos (Okujava et al., 2005). Em roedores, normalmente os animais costumam passar mais tempo explorando o objeto novo do que o objeto familiar na fase de teste (Ennaceur e Delacour, 1988; Gaskin et al., 2010). A maior preferência pelo objeto novo tende a ocorrer no início da fase de teste, enquanto o objeto ainda é relativamente novo, uma vez que no decorrer do tempo, o objeto torna-se familiar (Broadbent et al., 2010). Apesar dos animais passarem mais tempo explorando o objeto

novo, o desempenho do reconhecimento varia de acordo com o intervalo de retenção entre as sessões de treino e teste, e também o tempo para exploração durante a sessão de treino (Ennaceur e Delacour, 1988).

Os resultados do teste de NOR são influenciados por lesões no hipocampo (Buckmaster et al. 2004; Clark et al. 2000). Foi descrito que em ambos os cérebros de macaco e de rato, o córtex perirrinal desempenha um papel importante na memória de reconhecimento de objetos (Aggleton et al., 2010), dependendo da integridade do lobo temporal medial (Hammond et al., 2004). Esta estrutura do cérebro desempenha um papel importante na formação da memória de reconhecimento e, quando existe algum dano, o desempenho em tarefas de memória de reconhecimento é prejudicado (Albasser et al., 2009). Estudos com roedores e primatas mostraram que para a memória de reconhecimento de objetos, as regiões do lobo temporal são muito importantes (Hammond et al., 2004).

A consolidação da memória parece ser dependente do hipocampo (Clark, 2000). Durante a tarefa de NOR, a memória das características espaciais ou contextuais de objetos poderia ser realocada em diferentes partes do cérebro (Oliveira et al., 2010). Sabe-se que a taxa de neurogênese no hipocampo está relacionada com a consolidação da memória espacial (Sarkisyan e Hedlund, 2009). O hipocampo recebe entradas a partir do córtex perirrinal, que é o local de diversas entradas de informação como visual, olfativa e estímulo somato-sensorial, todos envolvidos no reconhecimento de objetos (Clarke et al., 2010). Na formação da memória, o hipocampo desempenha um papel importante, especialmente quando a informação espacial ou contextual é um fator relevante (Goulart et al., 2010). A existência de lesões no hipocampo induz o prejuízo da memória, mas a tarefa pode ser realizada, utilizando estratégias alternativas que envolvam outras regiões do cérebro (Broadbent et al., 2010). Apesar do hipocampo não ter um papel direto na discriminação das diferentes características de cada objeto, é fundamental como um detector de novidade por causa do seu papel na comparação de informações anteriormente armazenadas com os novos aspectos de entrada de uma situação particular (Clarke et al., 2010). As funções das estruturas do lobo temporal medial estão intimamente relacionadas, especialmente no hipocampo, que se estende e combina as funções realizadas pelo córtex adjacente (Clark et al., 2000). O córtex perirrinal desempenha papel no processamento perceptual e está envolvido na memória de reconhecimento de objetos (Baxter, 2010; Hammond et al., 2004). Quando ocorrem lesões nessa região do cérebro, o prejuízo na memória de reconhecimento pode ser observado (Aggleton et al., 2010). É possível sugerir que as lesões no córtex perirrinal poderiam contribuir para alguns aspectos da amnésia retrógrada, ocasionada por lesões do lobo temporal (Mumby et al., 2002).

Este tipo de memória foi anteriormente estudado em peixe-zebra, sendo avaliada a capacidade de discriminação entre objetos e a memória de reconhecimento de objetos. A exploração

de objetos por peixe-zebra é definida como nadar próximo aos objetos. No estudo realizado por May et al (2016), os peixes passaram mais tempo explorando o objeto familiar durante o teste, o que sugere um comportamento neofóbico. Esse achado contrasta com Braida et al. (2014a), em que o peixe-zebra mostrou preferência por formas novas quando mostradas em um monitor em um teste de reconhecimento de objeto virtual. Lucon-Xiccato e Dadda (2014) observaram que os animais têm uma tendência a explorar o novo objeto em uma versão modificada do teste de NOR. Pinheiro-da-Silva et al. (2017) demonstraram que os animais do grupo controle exploraram mais o objeto novo do que o objeto familiar na aplicação de um protocolo de privação de sono. No estudo de Oliveira et al. (2015), foi observado que o peixe-zebra tem capacidade de discriminação entre objetos baseada na cor e forma, mas não em tamanho. O estudo de Faillace et al. (2017) mostrou que o peixe-zebra tem um desempenho melhor em diferenciar mudanças de cores do que em formas e que a preferência pela cor influencia diretamente na preferência entre um objeto novo ou familiar, reforçando a importância da determinação de preferência inata neste tipo de tarefa. Nos estudos previamente realizados em peixe-zebra, somente a via de sinalização colinérgica foi avaliada (Braida et al., 2014a; May, 2016; Faillace et al., 2017).

1.2.2 Memória de localização de objetos

Modificações podem ser feitas no teste de reconhecimento de objeto para avaliar a capacidade dos animais de reconhecerem a posição específica dos objetos dentro de uma arena. A tarefa de localização de objetos também tem três etapas: habituação, treino e teste (Antunes e Biala, 2012). Nesta tarefa, primeiramente o animal é colocado na área de teste sem que os objetos estejam presentes para a habituação ao local. Após, o animal é colocado em uma área de retenção. Na sessão de treino, o animal é recolocado na área de teste onde dois objetos idênticos são apresentados. Após o intervalo de retenção, na fase de teste, os dois objetos idênticos usados na familiarização são colocados na área de teste, mas um deles é deslocado da posição original que representará uma novidade para o animal (Williams et al., 2007; Zheng et al., 2016).

A memória de localização de objetos é um aspecto importante da memória espacial, permitindo-nos lembrar das posições dos objetos em nosso ambiente. Existem diferentes processos cognitivos envolvidos na lembrança do objeto e a posição em que ele se encontra (Moscovitch et al., 1995). Duas áreas do cérebro de mamíferos parecem ser importantes para a localização de objetos, o lobo temporal medial e o córtex parietal posterior. O hipocampo e áreas associadas ao lobo temporal medial são essenciais para os processos de memória em geral, em particular a capacidade de relacionar características diferentes na memória, como objeto e a sua posição (Crane

e Milner, 2005; Hannula e Ranganath, 2008; Piekema et al., 2006; Pertzov et al., 2013). O córtex parietal é importante para uma variedade de processos de memória espacial, tais como a memória de trabalho, orientação e atenção espacial (Milner e Goodale, 1995; Moscovitch et al., 1995; Shafritz et al., 2002). Além disso, ele está envolvido na lembrança da relação entre objeto e local (Kessels et al., 2002; Sommer et al., 2005), possivelmente através de um mecanismo de atenção espacial (Kesner, 2009). Por conseguinte, tanto o hipocampo quanto o córtex parietal parecem importantes para a integração das informações de localização de objeto na memória de mamíferos (Kesner, 2009). O peixe-zebra explora o ambiente visualmente e, principalmente pela linha lateral, o que confere a capacidade de perceber elementos no ambiente como obstáculos e aproximação de predadores, sendo um sistema essencial para sua sobrevivência (Olive et al, 2016). Atualmente, somente um estudo avaliou a tarefa de localização de objetos em peixe-zebra e os resultados demonstram preferência em explorar o objeto na localização nova (Hamilton et al., 2016).

1.3 Vias neuroquímicas relacionadas à memória

1.3.1 Sistema Glutamatérgico

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e está envolvido em muitas funções básicas neuronais e processos no sistema nervoso central, especialmente no aprendizado, memória e plasticidade sináptica (Tarabeux et al., 2011), atuando pré- e pós-sinápticamente pela ativação de receptores de glutamato. Estes receptores são divididos em duas categorias principais: os metabotrópicos (mGluRs) e receptores ionotrópicos (iGluRs) (Nicoletti et al., 2011; Traynelis et al., 2010). Os mGluRs desencadeiam mensageiros secundários intracelulares através de proteínas G (Nicoletti et al., 2011). Em contraste, os iGluR são canais iônicos dependentes de ligantes que controlam as mudanças rápidas na concentração de sódio, cálcio e potássio. Os subtipos de iGluR incluem N-metil-D-aspartato (NMDA), o α -amino-3-hidroxi-5- receptor do ácido metil-4-isoxazolopropiónico (AMPA) e cainato (KA) (Traynelis et al., 2010). Evidências moleculares e farmacológicas mostram que a ativação das sinapses glutamatérgicas é essencial para a formação da memória de longo prazo (Fellini et al., 2009).

A excitação sináptica rápida no SNC é mediada principalmente pela ativação pós-sináptica de receptores de glutamato ionotrópicos AMPA e NMDA (Hunt e Castillo, 2012). Os receptores AMPA definem principalmente a transmissão sináptica basal, enquanto que os receptores de NMDA parecem estar principalmente envolvidos nas mudanças dependentes de atividade (Rebola et al., 2010). Quando o receptor NMDA é ativado, o Ca^{2+} intracelular aumenta, resultando em ativação de quinases e fosfatases que influenciam o estado de fosforilação de várias macromoléculas, incluindo os receptores de NMDA, AMPA e cainato (Köles et al., 2016). A remodelação de densidades pós-

sinápticas e formação de novas sinapses são alterações relacionadas com os principais mecanismos subjacentes da potenciação e depressão de longa duração (LTP e LTD) e da formação da memória (Lüscher et al., 2000).

Os receptores NMDA são necessários para a plasticidade sináptica, aprendizado e formação da memória (Miyamoto, 2006). No entanto, a atividade excessiva de receptores de NMDA pode resultar em morte celular (Lewerenz e Maher, 2015). Consequentemente, estes receptores estão envolvidos na patogênese da neurodegeneração em doenças, como a doença de Alzheimer, isquemia/hipóxia, Doença de Huntington, epilepsia, doença de Parkinson, esquizofrenia e transtornos do humor (Traynelis, et al., 2010; Rodríguez-Moreno e Sihra, 2007; Dingledine et al., 1999; Vyklicky et al., 2014; Machado-Vieira et al., 2009). Portanto, os receptores de NMDA são considerados alvos promissores para intervenção nas disfunções neuronais e para melhorar os sintomas de várias doenças humanas, sendo desenvolvidas diversas substâncias para alterar a atividade do receptor de NMDA como uma intervenção terapêutica (Traynelis, et al., 2010; Korinek et al., 2011).

O antagonista não-competitivo dos receptores de NMDA MK-801 é usado quase exclusivamente como um fármaco experimental para estudar processos comportamentais mediados pela via glutamatérgica. Procedimentos de aprendizado associativo foram utilizados para caracterizar os efeitos de MK-801 em processos de aprendizado e de memória em uma ampla gama de espécies (Castellano et al., 2001). Estudos anteriores demonstraram que os receptores NMDA e proteínas quinases desempenham um importante papel na plasticidade sináptica em encéfalo de peixe-zebra (Nam et al., 2004). Déficits de memória foram demonstrados em peixe-zebra tratados com MK-801 na tarefa de labirinto em Y (Cognato et al., 2012). As tarefas de esquiva inibitória têm sido amplamente empregadas em muitas espécies para medir déficits cognitivos associados com a administração de MK-801 no peixe-zebra (Blank et al., 2009; Ng et al., 2012; Seibt et al., 2011).

2. JUSTIFICATIVA

A memória permite que os animais possam adaptar e modificar seu comportamento diante de novas experiências. Uma série de fatores pode resultar em um déficit de memória como: doenças neurodegenerativas, alterações decorrentes de intoxicações e uso de fármacos como os benzodiazepínicos (Orzelska-Gorka et al., 2016; Lim e Alexander, 2009; Pike e Savage, 2008; Vakil, 2007). O peixe-zebra é um modelo que vem sendo usado para modelar características comportamentais humanas complexas, como o aprendizado e memória (Norton et al., 2010). Além disso, muitos sistemas de neurotransmissão excitatórios e inibitórios foram mapeados no sistema nervoso do peixe-zebra, tais como sistemas dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico, purinérgico, histaminérgico, nitrérgico, glutamatérgico, glicinérgico e gabaérgico (Panula et al., 2010; Rico et al., 2011). A tarefa de reconhecimento de objetos possibilita a investigação sobre alterações na memória, sendo usada para testar os efeitos de vários tratamentos farmacológicos e danos cerebrais (Goulart et al., 2010) sobre a memória. O estabelecimento de tarefas de reconhecimento e localização de objetos, bem como o estudo da influência das vias de sinalização e de fatores endócrinos, tais como o cortisol, contribuirá para o entendimento dos mecanismos envolvidos nesse tipo de memória.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver protocolos para as tarefas de memória de reconhecimento de objetos e de localização de objetos em peixe-zebra, bem como avaliar a influência da sinalização glutamatérgica nestes tipos de memória.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a preferência inata por cor dos objetos.
- Avaliar a preferência inata de pistas espaciais.
- Estabelecer um protocolo para avaliação da tarefa de memória de reconhecimento de objetos e de localização de objetos em peixe-zebra.
- Avaliar os efeitos do MK-801 na memória de reconhecimento e localização de objetos em peixe-zebra.
- Avaliar os níveis totais de cortisol em animais submetidos à diferentes protocolos de habituação.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

GASPARY KV, REOLON GK, BONAN CD. Influence of glutamatergic signaling and endocrine responses on novel object recognition or object location tasks in zebrafish.

Artigo submetido em 07 de fevereiro de 2018 ao periódico *Neurobiology of Learning and Memory*.

Neurobiology of Learning and Memory: Submission Confirmation

NLM (ELS) <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Responder a: "NLM (ELS)" <nlm@elsevier.com>
Para: cbonan@puccs.br, carla.boli@gmail.com
Cc: karina.gaspary@acad.puccs.br, gkreolon@gmail.com

7 de fevereiro de 2018 11:27

Title: Influence of glutamatergic signaling and endocrine responses on novel object recognition and object location tasks in zebrafish

Corresponding Author: Professor Carla Denise Bonan

Authors: Karina V Gaspary; Gustavo K Reolon;

Article Type: Research paper

Dear Professor Bonan,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Neurobiology of Learning and Memory.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Neurobiology of Learning and Memory as an author:

<https://ees.elsevier.com/ynlme/>

Your username is: cbonan@puccs.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/YNLME/automail_query.asp.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Neurobiology of Learning and Memory. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Ted Abel
Editor
Neurobiology of Learning and Memory
Elsevier
Email: nlm@elsevier.com

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Influence of glutamatergic signaling and endocrine responses on novel object recognition and object location tasks in zebrafish

Karina Vidarte Gaspar¹, Gustavo Kellermann Reolon¹, Carla Denise Bonan^{1*}

¹ Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Escola de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author: Carla Denise Bonan

Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Escola de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +55 51 3353 4158 /E-mail address: cbonan@pucrs.br

Abstract

This study aims to establish a protocol for evaluating the object recognition memory or object location tasks in zebrafish. We evaluated novel object recognition memory and analyzed the exploration time of novel and familiar objects in the training and test sessions. There was a preference of the animal to explore the new object in comparison to the familiar object (61% of exploration time). We also evaluated the object location task and measured the exploration time of each object in the familiar and novel object locations. There was a preference of the animal to explore the object in the novel location in comparison to the object in the familiar location (63% of exploration time). We also evaluated the effect of the non-competitive NMDA receptor antagonist MK-801 on the object recognition and object location memory in zebrafish. In this regimen treatment, control (water only) and treated animals (5 μ M MK-801) presented a significant preference in exploring the familiar object in comparison to the new object (66 and 68% of exploration time, respectively); however, 10 μ M MK-801-treated animals did not show differences in the exploration time of the objects. In the object location task, the animals treated with the 5 or 10 μ M MK-801 did not show a significant preference for the familiar or novel location whereas the control group had a higher preference in exploring the object in the familiar location (64% of exploration time). Considering the different responses of the control group between original task and in the regimen treatment, we evaluated the impact of habituation on cortisol levels of animals in three different protocols: 1) habituated at the experiment apparatus for 3 days (Condition 1 – C1), 2) habituated at the experiment apparatus for 3 days plus treatment tank exposure at fourth day (Condition 2 - C2), 3) habituated at the treatment tank exposure and experiment apparatus for 3 days and exposed to treatment tank again at fourth day (Condition 3 – C3). The results showed higher levels of cortisol in animals submitted to C2 and C3 conditions compared to animals submitted to C1. These results demonstrated that the animals submitted to treatment tank exposure have a different performance in object recognition and object location memory due to stress responses. Therefore, these tasks are prone to evaluate memory in physiological and pathological

conditions, but its use is limited to perform pharmacological studies due to sensitivity to stress caused by manipulation.

Keywords: cortisol; memory; MK-801; object location; object recognition; zebrafish

1. Introduction

Memory and learning allow animals to adapt and modify their behavior towards new experiences (Kandel, 2001). Learning and memory are complex processes of the brain that are dependent on specific structures of the central nervous system. Mostly, the hippocampus and amygdala are essential for data processing and information storage, related to declarative or explicit memories (Markram et al., 2007). Several studies show that this process occurs mainly in the hippocampus (Izquierdo et al., 2006). Other brain structures and different neurotransmitter systems may play an important role, depending on the nature of the memory being processed, such as the cerebellum for procedural or implicit memories (Izquierdo et al., 2006; Myskiw et al., 2010).

The inability to acquire and/or express information is named amnesia. This damage can either be manifested as a symptom of some clinical cases or characterized as a pathological condition (Pittenger, 2013). Amnesia can be caused by any pathological process that results in damage to the proper functioning of acquisition, consolidation and retrieval, usually a result of damage of brain structures involved in memory, such as the hippocampus and the amygdala (Riedel et al., 1999; Roesler et al., 2002). Other factors may result in memory deficits such as: hypoglycemia, trauma and brain tumors, neurodegenerative diseases (such as Alzheimer's disease and senile dementia), cerebral vascular accidents, changes due to intoxications, and the use of drugs such as benzodiazepines (Orzelska-Gorka et al., 2016; Lim and Alexander, 2009; Pike and Savage, 2008; Vakil, 2007). Animal models of learning and memory allow the analysis of the effect of pharmacological or genetic interventions on specific biochemical systems, enabling the evaluation of the role these systems in memory (Kapczinski et al., 2000).

Zebrafish can be used to model complex human behavioral traits, such as reward responsiveness, learning and memory, aggression, anxiety, and sleep (Norton and Bally-Cuif, 2010). Several tasks used in the zebrafish explicitly target memorial processes, for example maze learning, which is related to the context of spatial discrimination learning and certainly relies on memory (Cognato et al., 2012; Braida et al., 2014b; Grossman et al., 2010). Different tasks of avoidance

learning have been established in zebrafish (Blank, 2009). In these tests, avoidance learning is inferred by the amount of time spent outside the compartment previously associated with an aversive stimulus. This passive avoidance learning is frequently used to characterize associative learning and short- and long-term memory in zebrafish and has been used to characterize the effects of antipsychotics (Seibt et al., 2011), scopolamine (Kim et al., 2010; Richetti et al., 2011), MK-801 (Ng et al., 2012; Seibt et al., 2011) and adenosine agonists and antagonists (Bortolotto et al., 2015).

Among the tests used to evaluate amnesia models, there is the task of novel object recognition (NOR) (Ennaceur, 2010). The NOR is very useful for studying short-term and long-term memory, manipulating the retention interval, which is the amount of time between training and test sessions (Tagliabata et al., 2009). The greatest advantage conferred by the test is the fact that it does not require external motivation, reward or punishment, but habituation is necessary, and can be completed in a relatively short period of time (Silvers et al., 2007). NOR was previously studied in zebrafish, where the ability to discriminate different objects and the object recognition memory was evaluated. In previous studies, only the cholinergic signaling pathway was evaluated in zebrafish (Braida et al., 2014a; May et al., 2016, Faillace et al., 2017).

Changes may be made in the object recognition test to assess the animal ability to recognize the specific position of objects within an arena. The object location memory is an important aspect of spatial memory, allowing us to remember the position of objects in our environment. Different cognitive processes are involved in the recall object and the position it finds (Moscovitch et al., 1995).

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter of the central nervous system and is involved in many basic neuronal functions and in processes the central nervous system, especially in learning, memory and synaptic plasticity (Tarabeux et al., 2011), acting pre- and post-synaptically by the activation of glutamate receptors. NMDA receptors are required for synaptic plasticity, learning and memory formation (Tsai, 2016). The non-competitive NMDA receptor antagonist MK-801 is used almost exclusively as an experimental drug to study behavioral

processes mediated by the glutamatergic pathway. Memory deficits were demonstrated in zebrafish treated with MK-801 in the Y-maze task (Cognato et al., 2012). Avoidance tasks have been used to measure cognitive deficits associated with MK-801 administration in zebrafish (Blank et al, 2009; Seibt et al., 2011).

This study aims to establish a protocol for evaluating the memory of object recognition or object location in zebrafish. We also evaluated the influence of glutamatergic signaling, testing the effect of MK-801 on the object recognition or object localization memory in zebrafish and the impact of changes in habituation protocols on cortisol levels of animals.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Adults (6-7 months) wild-type zebrafish (*Danio rerio*) were used. Animals were obtained from our breeding colony and kept in automated re-circulating systems (Zebtec, Tecniplast, Italy) with reverse osmosis filtered water equilibrated to reach the species recommended temperature ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), pH (7.0 and 7.5), conductivity and ammonia, nitrite, nitrate and chloride levels. Animals were subjected to a light/dark cycle of 14/10 hours, respectively. Animals were fed with paramecium between 6 and 14 days post fertilization (dpf) of age and received commercial flakes (TetraMin Tropical Flake Fish®) three times a day supplemented with brine shrimp (Westerfield, 2000) after 14 dpf. All protocols were approved by the Institutional Animal Care Committee from Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA-PUCRS, protocol number 16/7574).

2.2 Color innate preference

The objects used were simple 3D (cube) geometric shapes made of non-toxic plastic with \approx 2 cm in size in blue and yellow colors that did not show high preference in previous studies (Faillace et al., 2017).

The experimental apparatus consisted of a 10L-glass tank (35 cm \times 35 cm \times 10 cm) filled

with 6 cm of water. The sides of the apparatus were covered externally by black plastic (to reduce external interference). The animal was exposed to two objects with different colors (blue vs. yellow) for 20 minutes. After, the preference was evaluated over periods of 0-5 minutes, 0-10 minutes, 0-15 minutes, and 0-20 minutes to determine the time to be used for the object recognition task. We evaluated the exploration time of each object (%).

2.3 Novel object recognition task

The experimental apparatus and objects used were previously mentioned in the subsection 2.2 of the experiment for which the animals showed no innate preference (yellow and blue cubes). Before training, each animal was habituated to experimental apparatus in the absence of objects for 5 min twice a day (5-h interval between habituation sessions) over three consecutive days. On the fourth day, in the training phase, animals were exposed to two identical cubes for 15 min. After the training, the animals were submitted to a retention interval of 1 h. In the test, a new object replaced one of the copies of the familiar object and the exploration time of each object was evaluated for 15 minutes. The locations of the object in the tank were random to avoid the influence of external factors. We evaluated the exploration time of each object (%). The exploration area was defined as 8 × 8 cm area centered on the object and preference percentages were calculated as: [time of exploration of novel object / time of exploration of familiar object + time of exploration of novel object × 100].

2.3.1 Principal Component Analysis (PCA)

The Principal Component Analysis (PCA) was used to classify different fish regarding novel object recognition performance in a multivariate ordination (Chen et al., 2016). In brief, PCA is a technique that makes clusters of samples according to similarity, based on several variables simultaneously. Essentially, samples grouped on the plot are quite similar to each other. Point clusters in different regions of the graph indicate that the samples are different in the analyzed

variables. Each variable has a vector (line). The values of the variable increase in the direction of the vector: if the vector points far to the right, samples to the right have larger values of the vector variable, while the samples to the left have smaller values of the same variable represented by the vector. This allows to observe if the variables (vectors = rows) are correlated (both pointing to the same direction), independent (90 degree angle between them) or inversely correlated (each pointing to a different side of the graph). The following parameters were considered for training and testing characteristics: % of time exploring the new object, total time exploring both objects in training, total time exploring both objects in test, time in zone A in training, time in zone B in training, latency to zone B in training, mobile time in training, mobile time in test, and latency to zone B in test. The data were analyzed by a Principal Component Analysis (PCA).

2.4 Cue innate preference

For the object location task (subsection 2.5), spatial cues were used and the animal is aware of the location of the object within the apparatus. To evaluate the innate preference for spatial cues, combinations of different shapes (square, circle, triangle, and diamond) were used in different sectors. The experimental apparatus (a 10L-tank glass; 35 cm × 35cm × 10 cm) was externally covered in black and the spatial cues attached to the outside of the apparatus having the same color and size, as performed in previous studies (Cognato et al., 2012; Braida et al., 2014a), where the preference for forms was not observed. The tank was divided virtually in two sectors, with different geometric shapes as spatial indications. The preference for the sectors was evaluated in the periods of 0-5 minutes, 0-10 minutes, 0-15 minutes and 0-20 minutes to determine the time to be used for the object location task. The exploration time of each sector (%) was evaluated.

2.5 Object location task

The animals were tested in the same experimental apparatus used for the analysis of the cue innate preference. The objects were previously selected in the Subsection 2.2, in which the animals

showed no innate preference. The sides of the apparatus were covered externally by black plastic containing the spatial cues selected according Subsection 2.4. Before training, each zebrafish was habituated to experimental apparatus in the absence of objects for 5 min twice a day (5-h interval between habituation sessions) over three consecutive days. On the fourth day, in the training phase, animals were exposed to two identical cubes for 15 min in the same sector (initial location). After the training, the animals were submitted to a retention interval of 1h. In the test, one object remained in the initial location and another was moved to a novel location and evaluated for 15 minutes. The locations of the object and the tank were randomized to avoid the influence of external factors. The objects were kept the same distances from the walls to avoid thigmotaxis (the tendency of the animal to remain near the corners of the aquarium), which may affect the performance. We evaluated the exploration time of each object (%).

2.6. MK-801 treatment

All groups were previously submitted to habituation protocol, which consists in the exposure to the treatment tank (600 ml Becker) for 15 min and, subsequently, to experimental apparatus in the absence of objects for 5 min twice daily (5-h interval between habituation sessions) over three consecutive days. In the fourth day, the animals were exposed to 5 or 10 μ M MK-801 (Cognato et al., 2012) or only water for control group. Treatments were administered by immersing the fish in a treatment tank filled with 400 ml of solution (MK-801) for 15 minutes prior to the object recognition or location task.

2.7 Cortisol levels

The control animals were submitted to three different habituation protocols named Condition 1, 2 or 3 (C1, C2, C3, respectively) to evaluate the effects of these changes on the cortisol levels of animals in situations similar to those tested previously. In the Condition 1 (C1), the animals were habituated individually, exploring experimental apparatus without objects for 5

minutes twice a day (5 hour-interval between sessions) for 3 consecutive days and on the fourth day the sample was collected. In Condition 2 (C2), the animals were habituated individually, exploring the experimental apparatus without objects for 5 minutes twice daily (5 hour-interval between sessions) for 3 consecutive days; in the fourth day, they were exposed to treatment tank with water for 15 minutes and the sample was collected. In Condition 3 (C3), the animals were habituated individually, exploring the treatment tank for 15 minutes and to the experiment apparatus without objects for 5 minutes twice daily (5 hour-interval between sessions) for 3 days consecutive; in the fourth day, they were exposed to treatment tank with water for 15 minutes and the sample was collected.

Each fish was weighed, minced, and placed into a disposable stomacher bag with 2 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for 6 min. The contents were then transferred to a 10-mL screw top disposable test tube to which 5 mL of laboratory grade ethyl ether was added. The tube was vortexed for 1 min and centrifuged for 10 min at 1000 x g, which it was immediately frozen in liquid nitrogen. The unfrozen portion (ethyl ether containing cortisol) was decanted and transferred to a new tube, where it was completely evaporated under a gentle stream of nitrogen for 2 h, yielding a lipid extract containing the cortisol, which was stored at -20°C . Body extracts were re-suspended in 1 mL of phosphate buffered saline (PBS) and whole-body cortisol levels were measured in duplicate samples of each extract using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (EIAgenTMCORTISOL test, BioChem ImmunoSystems). Whole-body cortisol was extracted using the method described by Sink et al. (2008).

2.8 Statistical analysis

All trials were video recorded and all videos were analyzed using the Noldus EthoVision XT7 software. The behavioral analysis were evaluated by Student's t-test and whole body cortisol levels were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test, using the Graphpad software, where $p < 0.05$ indicates significant difference.

3. Results

3.1 Color innate preference

The exploration time of each object (%) was analyzed and the preference was evaluated in different time periods (Figure 1). The results showed that the animal had no preference between objects (blue cube and yellow cube) during periods of 0-5 minutes ($p = 0.6630$; Fig 1a), 0-10 minutes ($p = 0.9337$; Fig 1b), 0-15 minutes ($p = 0.8812$; Fig 1c) and 0-20 minutes ($p = 0.9534$; Fig 1d). As there was no preference between the objects, they were used for the subsequent experiments. For the object recognition task, the evaluation time of 15 minutes was chosen.

3.2 Cues innate preference

The exploration time of each sector (%), containing different spatial cues was analyzed and the preference was evaluated in different time periods (Figure 2). The results did not show preference between the spatial cues circle and diamond during the 0-5 minutes ($p = 0.7164$; Fig 2a), 0-10 minutes ($p = 0.7691$; Fig 2b), 0-15 minutes ($p = 0.5504$; Fig 2c) and 0-20 minutes ($p = 0.3950$; Fig 2d). As there was no preference among these spatial cues, they were used for the object localization task. For the object location task, the evaluation time of 15 minutes was determined.

3.3 Object recognition task

A PCA analysis was performed to evaluate the factors in the training session that would be determinant for the performance of the animal during the test session, creating a correlation. Many inferences can be made from PCA (Figure 3). If we consider the vector "% of time exploring the new object", this is the most important vector, because it determines whether the animals learned or not the task. In addition, it may be related with the other vectors that have positive values in X-axis and negative Y-axis (i.e. located in the same quadrant). Thus, it is possible to observe a correlation of the following parameters: time in zone 2 in the test, total time exploring both objects in training,

total time exploring each zone (Q1 and Q2) in the training and the total time exploring both objects in the test. Based on these results, a filter was determined for the object recognition task, where only the animals that explored both objects during the training in a total time equal to or exceeding 400 seconds were considered.

Figure 4 shows the exploration time of each object (%) in the object recognition task. In the training, no preference was observed between objects A and B ($p = 0.3340$; Figure 4a). In the test session, we observed a preference of the animal to explore the new object in comparison to the familiar object ($p < 0.01$; Figure 4b).

3.3.1 *Effects of MK-801 on object recognition memory*

Figure 5 shows that control animals (Figure 5a) had a preference in exploring the familiar object rather than the new object ($p < 0.01$). Similarly, the animals treated with 5 μM MK-801 group (Figure 5b) also presented a significant preference in exploring the familiar object in comparison to the new object ($p < 0.01$). When the 10 μM MK-801- treated group (Figure 5c) was evaluated, there was no difference in the exploration of the objects ($p = 0.1639$); however, 10 μM MK-801- treated group showed increase in distance traveled ($p < 0.0001$; Figure 5d) which was not observed 5 μM MK-801- treated animals (data not shown).

3.4 *Object location task*

We evaluated the exploration time of each object (%) in the object localization task. In the training session, no preference was observed between objects A and B ($p = 0.5096$; Figure 6a). In the test session, we observed a preference of the animal to explore the object in the new location in comparison to the familiar location during the test ($p < 0.01$; Figure 6b).

3.4.1 *Effects of MK-801 on object location memory*

Figure 7 shows that the control group (Figure 7a) had a preference in exploring the object in

the familiar location rather than in the new location ($p < 0.01$). However, the animals treated with 5 or 10 μM MK-801 (Figure 7b and 7c, respectively) did not show a significant preference ($p = 0.2397$ and $p = 0.6599$, respectively). However, there is an increase in distance traveled ($p < 0.001$) for 10 μM MK-801-treated group (Figure 7d), which was not observed for 5 μM MK-801-treated animals (data not shown).

3.5 Cortisol levels

Considering the control group had preference for the novel object or location and, after exposure to treatment tank, showed opposite results, in which developed preference for the familiar object or location, we evaluated the impact of habituation on cortisol levels of animals. The results showed higher levels of cortisol in animals submitted to C2 and C3 conditions compared to animals submitted to C1 conditions ($p < 0.001$; Figure 8).

4. Discussion

In this study, we developed a protocol for evaluating the memory of object recognition or object location in zebrafish. We also observed that the MK-801 treatment impaired the object location memory and occurred a change in preference pattern in object recognition and object location memory due to stress responses.

The novel object recognition task is very useful for studying short-term memory and long-term memory, manipulating the retention interval, which is the amount of time between training and testing sessions (Tagliabue et al., 2009). Firstly, we evaluated the innate preference of object colors, since the object choice is one of the most important and underappreciated aspects of conducting an object recognition or object location memory protocol (Ennaceur, 2010). Since this task relies on innate preference for novelty, all objects used for this protocol should meet the following criteria: 1) do not produce a fear response, 2) are adequately explored during a test session 3) if used for novel object recognition, the two object have equal innate preference and can

be discriminated. Oliveira et al. (2015) observed that the zebrafish has the ability to discriminate between objects based on color and shape but not on size. In addition, Faillace et al. (2017) demonstrated zebrafish was better at discriminating color changes than object shape or size and the color directly influences the preference between a new or familiar object, reinforcing the importance of determination preference innate in this type of task. Peeters et al. (2016) also showed that the location of the color appears to be of critical importance. Presentation of the color on the walls induces an approach response whereas presentation on the bottom induces an aversion. Therefore, it is important to evaluate the preference directly for the objects to be used, since zebrafish seems to have a different perception of being in an environment of a certain color and having an object of a certain color in the same environment. This can be an explanation for controversial results in the literature considering the method of presentation of the color in the task. Since there was no preference between the objects, they were considered suitable for the tasks.

Spatial learning is the process that allows the human or non-human animal to acquire spatial cues and the dynamic relationships among these cues. Therefore, spatial learning leads to the establishment of a spatial map, a neural representation of the external environment (Karnik and Gerlai, 2012). Previous studies confirm that zebrafish has the ability to perform well in associative learning tasks (Sison and Gerlai, 2010). Braida et al. (2014a) showed that the obtained discrimination indices are comparable to those previously found in mice submitted to the same task. For the object location task, spatial cues were used and the animal is aware of the location of the object within the apparatus. To evaluate the innate preference for spatial cues, combinations of different shapes (square, circle, triangle, and diamond) in different sectors were evaluated. The apparatus was externally covered in black and the spatial cues were attached to the outside of the apparatus having the same color and size, as performed in previous memory studies (Cognato et al., 2012; Braida et al., 2014a), where the preference for forms was not observed. Our results did not show preference between the spatial cues circle and diamond and they were used for the object localization task.

The novel object recognition memory was previously studied in zebrafish, where the ability to discriminate different objects and the memory of object recognition was evaluated. The exploration of objects by zebrafish is defined as swimming close to objects. May et al. (2016) showed that fish spent more time exploring the familiar object during the test, suggesting a neophobic behavior. In contrast, Braida et al. (2014a) observed zebrafish showed preference for new shapes when presented in a virtual object recognition test. Lucon-Xiccato and Dadda (2014) also observed that animals have a tendency to explore the new object in a modified version of the NOR test. Pinheiro-da-Silva et al. (2017) demonstrated that the control animals explored more the new object than the familiar object whereas there was no preference for the objects in sleep-deprived animals. The contrasting results may be explained by factors, such as the complexity level of the task and the objects as well and the type of habituation that would influence the performance during tasks. May et al. (2016) used objects (Lego® figures) with high complexity combining several colors and shapes and a short habituation period. Such factors may have contributed to a neophobic behavior due to the several variants presented as novelty at one trial. Studies demonstrating a neophilic behavior used simpler 2D or 3D forms, longer or repeated habituation periods and/or environmental enrichment to reduce stress (Lucon-Xiccato and Dadda, 2014). Our findings demonstrated a preference for novel object in the object recognition memory task, which are in agreement with the previous studies using simpler forms and repeated habituation periods. However, when we tested the effect of MK-801, we observed contrasting effects with preference for the familiar object for the control and 5 μ M MK-801-treated groups. There was no preference for the 10 μ M MK-801-treated group possibly due to a hyperlocomotor effect caused by this drug. Previous studies have already demonstrated that 5 μ M MK-801 did not alter locomotor activity whereas higher MK-801 concentrations induced an increase of locomotor parameters (Seibt et al., 2010; 2011).

For the object location task, we observed a preference of the animal to explore the new object in comparison to the familiar object during the test session. Hamilton et al. (2016)

demonstrate that when zebrafish were exposed to familiar object in a familiar context, but at novel location within that context, they spend more time in the novel quadrant. This indicate that zebrafish are capable to display episodic-like memory as they discriminate the type, location and the context in the object was presented (Hamilton et al., 2016). However, in our study, the animals treated with the 5 or 10 μ M MK-801 did not show a significant difference in the exploration of the objects, but an increase in distance traveled ($p < 0.001$) was observed in the animals treated with 10 μ M MK-801. Therefore, it is possible to suggest that 5 μ M MK-801 impaired the memory formation in an object location task, which is in agreement with previous studies demonstrating the cognitive deficit induced by MK-801 treatment in aversive (Seibt et al., 2011) and spatial memory (Cognato et al., 2012).

Our findings also demonstrated a change of preference pattern for the objects, when a new element (treatment tank) was introduced in the protocol, since the animals spent more time exploring the familiar object or location after treatment tank exposure. Our results demonstrated a higher cortisol levels to C2 and C3 conditions, in which there was treatment tank exposure than C1 condition (no exposure to treatment tank). Previous studies demonstrated that adrenal stress hormones, epinephrine and cortisol released by emotional arousal play an important role in enabling the significance of an experience to regulate the strength of memory of an experience (Meir Drexler and Wolf, 2017). This may suggest that the animals submitted to treatment tank exposure (C2 and C3 conditions) present stress responses, which can affect their performance during object recognition and location memory tasks. Our findings indicate that these tasks are highly sensitive to experimental manipulation, which suggest that the memory tested is labile in zebrafish. In addition, the use of these tasks may be restricted due to the sensitivity to stress caused experimental manipulation, which may impair the development of pharmacological studies.

In summary, the novel object recognition and object location tasks are promising to evaluate memory in physiological and pathological conditions in zebrafish and glutamatergic signaling may modulate the memory processing.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. 446025/2014-3). K.V.G. were the recipient of a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). C.D.B were recipients of a fellowship from CNPq.

References

- Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2009; 92: 529-34.
- Bortolotto JW, Melo GM, Cognato Gde P, Vianna MR, Bonan CD. Modulation of adenosine signaling prevents scopolamine-induced cognitive impairment in zebrafish. *Neurobiol Learn Mem.* 2015; 118: 113-9.
- Braida D, Ponzoni L, Martucci R, Sala M. A new model to study visual attention in zebrafish, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2014a; 55: 80–86.
- Braida D, Ponzoni L, Martucci R, Sparatore F, Gotti C, Sala M. Role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) on learning and memory in zebrafish. *Psychopharmacology (Berl).* 2014b; 231:1975–85.
- Chen H, Pan X, Lau JK, Bickerton WL, Pradeep B, Taheri M, Humphreys G, Rotshtein P. Lesion-symptom mapping of a complex figure copy task: A large-scale PCA study of the BCoS trial. *Neuroimage Clin.* 2016;11:622-34.
- Cognato G de P, Bortolotto JW, Blazina AR, Christoff RR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Y-Maze memory task in zebrafish (*Danio rerio*): the role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods. *Neurobiol Learn Mem.* 2012; 98: 321-8.
- CONCEA – Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, 2013. Disponível em: <file:///C:/Users/D%C3%A9bora/Downloads/DIRETRIZES%20DA%20PR%C3%81TICA%20DE%20EUTAN%C3%81SIA%20DO%20CONCEA.pdf>> Acesso em: 10 maio de 2017.
- Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1. Behavioral data. *Behav Brain Res.* 1988; 31:47–59.
- Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res.* 2010; 215: 244–254.
- Faillace MP, Pisera-Fuster A, Medrano MP, Bejarano AC, Bernbeu RO. Short- and long-term effects

of nicotine and the histone deacetylase inhibitor phenylbutyrate on novel object recognition in zebrafish. *Psychopharmacology*. 2017; 234:943–955

Grossman L, Utterback E, Stewart A, Gaikwad S, Chung KM, Suci C, et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav Brain Res*. 2010; 214: 277–84.

Hamilton TJ, Myggland A, Duperreault E, May Z, Gallup J, Powell RA, Schalomon M, Digweed SM. Episodic-like memory in zebrafish. *Anim Cogn*. 2016 Nov;19(6):1071-1079.

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci*. 2006; 29: 496–505.

Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*. 2001; 294: 1030–1038.

Karnik I, Gerlai R. Can zebrafish learn spatial tasks? An empirical analysis of place and single CS–US associative learning. *Behavioural Brain Research*. 2012; 233: 415– 421.

Kapczinski F, et al. *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

Kim YH, Lee Y, Kim D, Jung MW, Lee CJ. Scopolamine-induced learning impairment reversed by physostigmine in zebrafish. *Neurosci Res*. 2010 Jun;67(2):156-61.

Kirsten K, Fior D, Kreutz LC, Barcellos LJG. First description of behavior and immune system relationship in fish. *Sci Rep*. 2018 Jan 16;8(1):846.

Levin ED, Chen E. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*. 2004); 26:731–735.

Lim C, Alexander MP. Stroke and episodic memory disorders. *Neuropsychologia*. 2009;47(14):3045-58.

Lucon-Xiccato T, Dadda M. Assessing memory in zebrafish using the one-trial test. *Behav. Processes*. 2014; 106: 1–4.

Markram K, Gerardy-Schahn R, Sandi C. Selective learning and memory impairments in mice

- deficient for polysialylated NCAM in adulthood. *Neuroscience*. 2007; 144: 788–796.
- May Z, Morrill A, Holcombe A, Johnston T, Gallup J, Fouad K, Schalomon M, Hamilton TJ. Object recognition memory in zebrafish. *Behavioural Brain Research*. 2016; 296: 199–210.
- Meir Drexler S, Wolf OT. The role of glucocorticoids in emotional memory reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem*. 2017;142(Pt A):126-134.
- Moscovitch M, Kapur S, Kohler S, & Houle S. Distinct neural correlates of visual long-term memory for spatial location and object identity: A position emission tomography study in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1995; 92,: 3721–3725.
- Myskiw JC, Fiorenza NG, Izquierdo LA, Izquierdo I. Molecular mechanisms in hippocampus and basolateral amygdala but not in parietal or cingulate cortex involved in extinction of one-trial avoidance learning. *Neurobiol Learn Mem*. 2010; 94: 285–91.
- Ng MC, Hsu CP, Wu YJ, Wu SY, Yang YL, Lu KT. Effect of MK-801-induced impairment of inhibitory avoidance learning in zebrafish via inactivation of extracellular signal regulated kinase (ERK) in telencephalon. *Fish Physiol Biochem* 2012; 38: 1099–106.
- Norton W, Bally-Cuif L. Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neurosci*. 2010; 11: 90.
- Oliveira J, Silveira M, Chacon D, Luchiari A. The zebrafish world of colors and shapes: preference and discrimination. *Zebrafish*. 2015; 12(2):166-73.
- Orzelska-Gorka J, Talarek S, Listos J, Kedzierska E, Fidecka S. L-NAME differential effects on diazepam and flunitrazepam responses of rats in the object recognition test. *Pharmacological Reports*. 2016; 68: 728–732.
- Peeters BW, Moeskops M, Veenvliet AR. Peeters BW, Moeskops M, Veenvliet AR. Color Preference in *Danio rerio*: Effects of Age and Anxiolytic Treatments. *Zebrafish*. 2016; 13(4):330-4.
- Pike KE, and Savage G. Memory profiling in Mild Cognitive impairment: can we determine risk for Alzheimer's disease. *J.Neuropsychol*. 2008; 2: 361–372.

- Pinheiro-da-Silva J, Silva PF, Nogueira MB, Luchiarini AC. Sleep deprivation effects on object discrimination task in zebrafish (*Danio rerio*) *Anim Cogn*. 2017 20:159–169.
- Pittenger C. Disorders of memory and plasticity in psychiatric disease *Dialogues Clin Neurosci*. 2013; 15: 455-463.
- Richetti SK, Blank M, Capiotti KM, Piato AL, Bogo MR, Vianna MR, Bonan CD. Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behav Brain Res*. 2011;217(1):10-5.
- Roesler R, Roozendaal B, McGaugh JL. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training. *European Journal of Neuroscience*. 2002; 15: 905–910.
- Seibt KJ, Oliveira Rda L, Zimmermann FF, Capiotti KM, Bogo MR, Ghisleni G, Bonan CD. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2010; 214(2):417-22.
- Seibt KJ, Piato AL, da Luz Oliveira R, Capiotti KM, Vianna MR, Bonan CD. Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 2011;224:135–9.
- Silvers JM, Harrod SB, Mactutus CF, Booze RM. Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. *J Neurosci Met*. 2007; 166:99–103.
- Sink TD, Lochmann RT, Fecteau KA. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. *Fish Physiol Biochem*. 2008 Mar;34(1):95-101
- Sison M, Gerlai R. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behavioural Brain Research* 2010;207:99–104.
- Taglialatela G, Hogan D, Zhang WR, Dineley KT. Intermediate and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition. *Behav Brain Res*. 2009; 200: 95–99.

Tarabeux J, Kebir O, Gauthier J, Hamdan FF, Xiong L, Piton A, Spiegelman D, Henrion É, Millet B; S2D team, Fathalli F, Joobar R, Rapoport JL, DeLisi LE, Fombonne É, Mottron L, Forget-Dubois N, Boivin M, Michaud JL, Drapeau P, Lafrenière RG, Rouleau GA, Krebs MO. Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2011; 1: 55.

Tsai GE. Ultimate Translation: Developing Therapeutics Targeting on N-Methyl-d-Aspartate Receptor. *Adv Pharmacol*. 2016;76:257-309.

Vakil E. The effect of moderate to severe Traumatic Brain Injury (TBI) on different aspects of memory: a selected review. *J.Clin.Exp.Neuropsychol*. 2007; 27: 977–1021

Westerfield M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*).

Eugene: university of Oregon Press, 2000. Disponível em:

<http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html> Acesso em: 20 de maio de 2017.

Figure Legends

Figure 1. Color innate preference. The exploration time of each object (%) was analyzed and the preference was evaluated in periods of 0-5 minutes (a), 0-10 minutes (b), 0-15 minutes (c) and 0-20 minutes (d). A and B represent the two objects tested (blue or yellow cubes). The data are expressed as the mean \pm S.E.M (n=18), and were analyzed by Student's t-test.

Figure 2. Cues innate preference. The exploration time of each object (%) was analyzed and the preference was evaluated in periods of 0-5 minutes (a), 0-10 minutes (b), 0-15 minutes (c) and 0-20 minutes (d). A and B represent the two sectors tested (circle or diamond cues). The data are expressed as the mean \pm S.E.M (n=15), and were analyzed by Student's t-test.

Figure 3. Principal Component Analysis (PCA). The Principal Component Analysis (PCA) was used to classify different fish regarding novel object recognition performance in a multivariate ordination. Symbol and color coded: Green = % exploration of the new object above 70%; Yellow = % of exploration of the new object above 40-69%; Red = % exploration of the new object below 39%; Triangle = high time of exploration of objects during training; Diamond = intermediate time of exploration of objects during training; Inverted triangle = low time of exploration of objects during training. The data were analyzed by a Principal Component Analysis (PCA).

Figure 4. Object recognition task. The exploration time of each object (%) was analyzed during training between two identical objects A and B (a) and between the new object (NO) and the familiar object (FO) and in the test session (b). The image (c) shows the task during training (left) and test (right), with exploration areas indicated. The data are expressed as the mean \pm S.E.M (n=22), and were analyzed by Student's t-test, ** represents significant difference at $p \leq 0.01$.

Figure 5. Effects of MK-801 on object recognition memory. The exploration time of each object (%) was analyzed in the test session between new object (NO) and familiar object (FO). The animals were exposed to water for controls group (a), 5 (b) or 10 μ M (c) MK-801. The group treated with 10 μ M MK-801 showed an increase in distance traveled (d). The data are expressed as the mean \pm S.E.M (n= 12 per group), and were analyzed by Student's t-test, ** represents significant difference at $p \leq 0.01$ and **** $p \leq 0.0001$.

Figure 6. Object location task. The exploration time of each object (%) was analyzed during training between A and B objects in the initial location (a) and between the object in the novel location (NL) and in the familiar location (FL) in the test session (b). The image (c) shows the task during training (left) and test (right). The data are expressed as the mean \pm S.E.M (n=21), and were analyzed by Student's t-test, ** represents significant difference at $p \leq 0.01$.

Figure 7. Effects of MK-801 on object location task. The exploration time of each object (%) was analyzed in the test session between object in the new location (NL) and in the familiar location (FL). The animals were exposed to water for control group (a), 5 (b) or (c) 10 μ M MK-801. The group treated with 10 μ M MK-801 showed an increase in distance traveled (d). The data are expressed as the mean \pm S.E.M (n= 12 per group), and were analyzed by Student's t-test, ** represents significant difference at $p \leq 0.01$.

Figure 8. Cortisol levels. Whole-body cortisol levels were analyzed for each group. The animals were submitted to three different habituation protocols named Condition (C1, C2, C3). The data are expressed as the mean \pm S.E.M (N= 3 per group) and were analyzed by One-way ANOVA, followed by a post-hoc Tukey's test. * represents significant difference at $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$.

Figure 1.

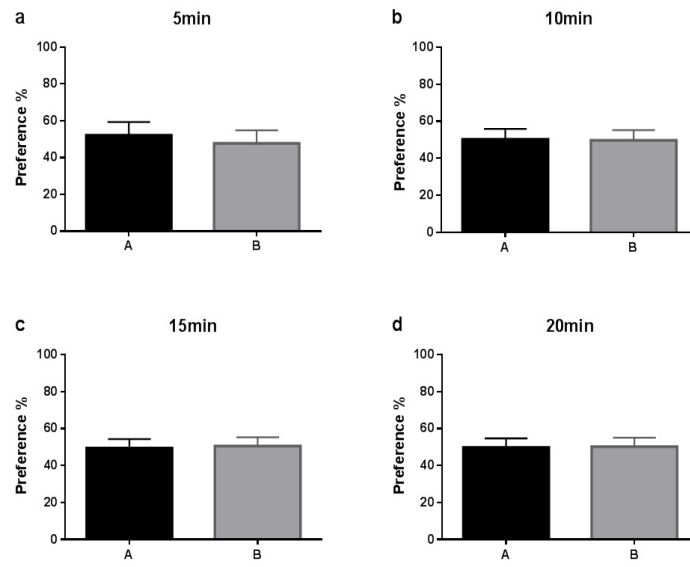


Figure 2.

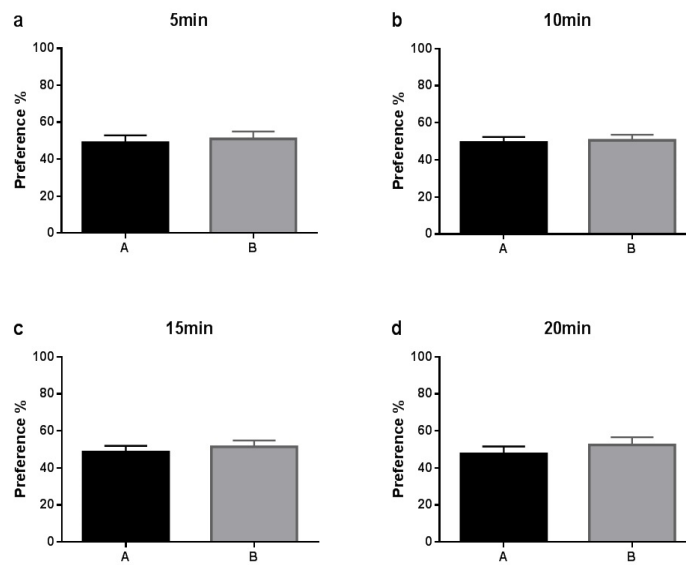


Figure 3.

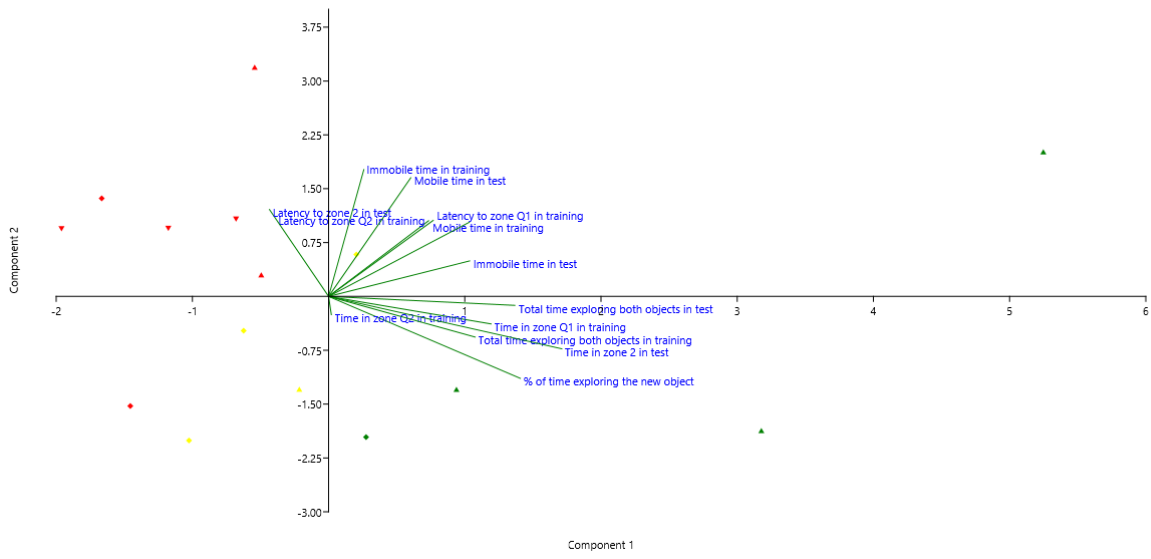


Figure 4.

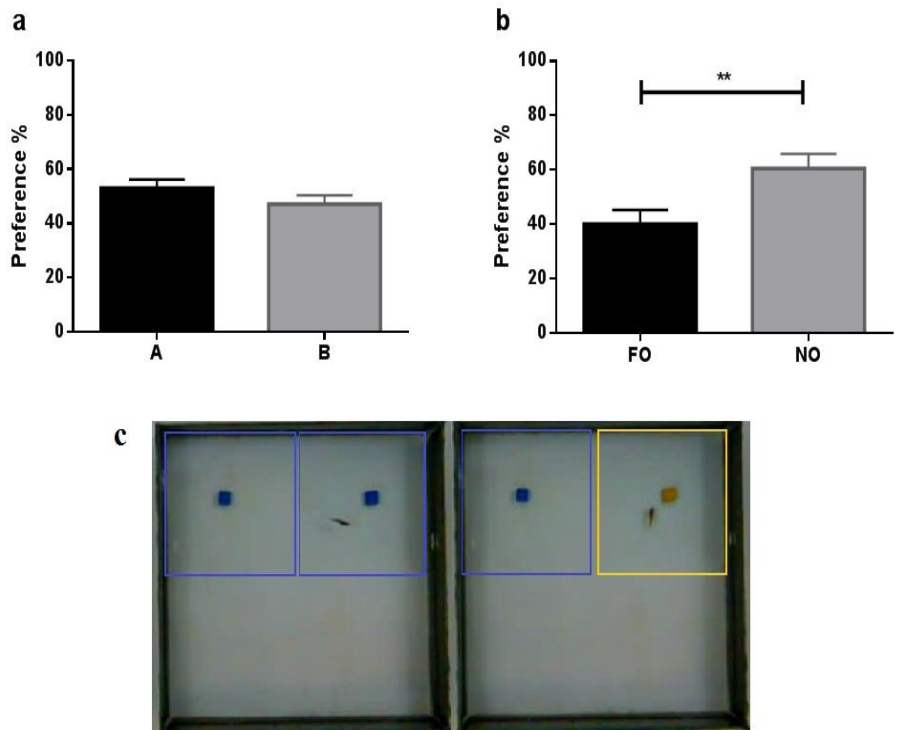


Figure 5.

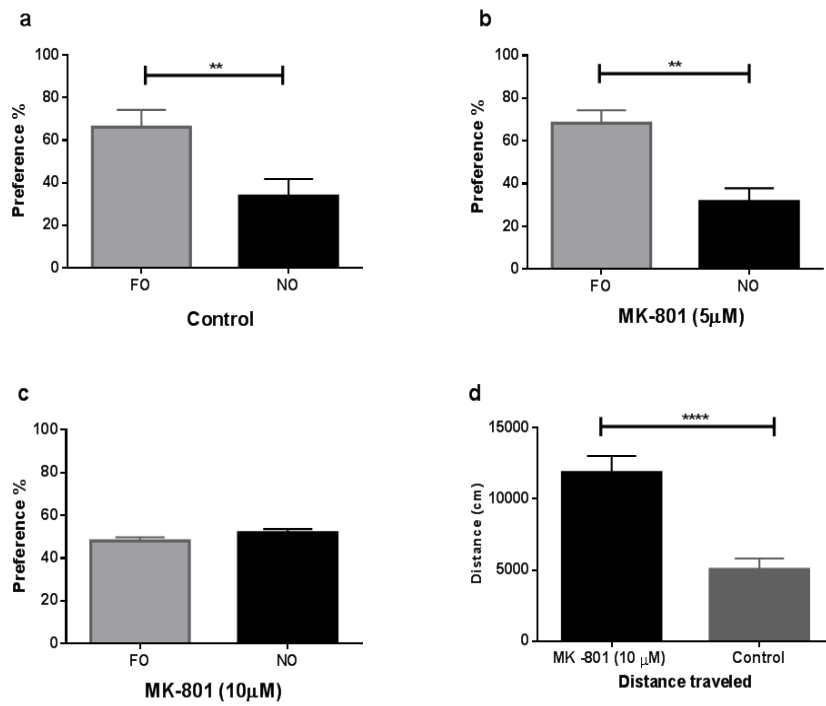


Figure 6.

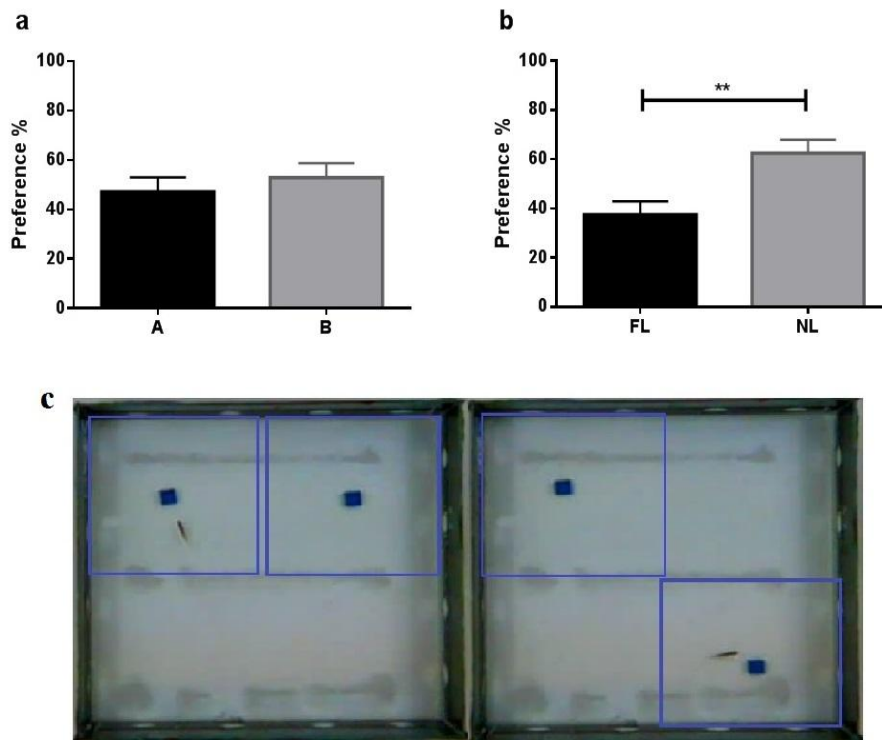


Figure 7.

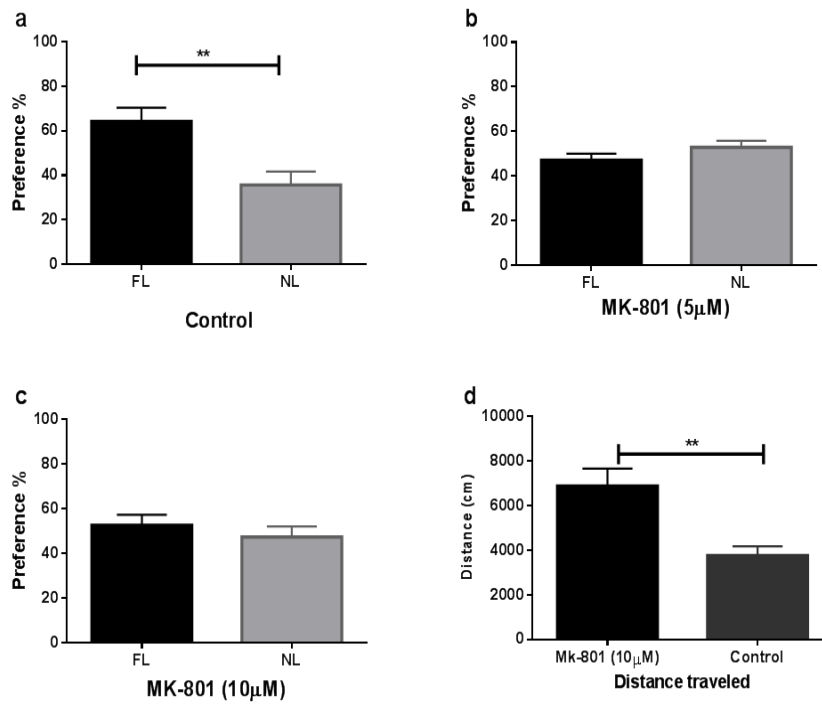
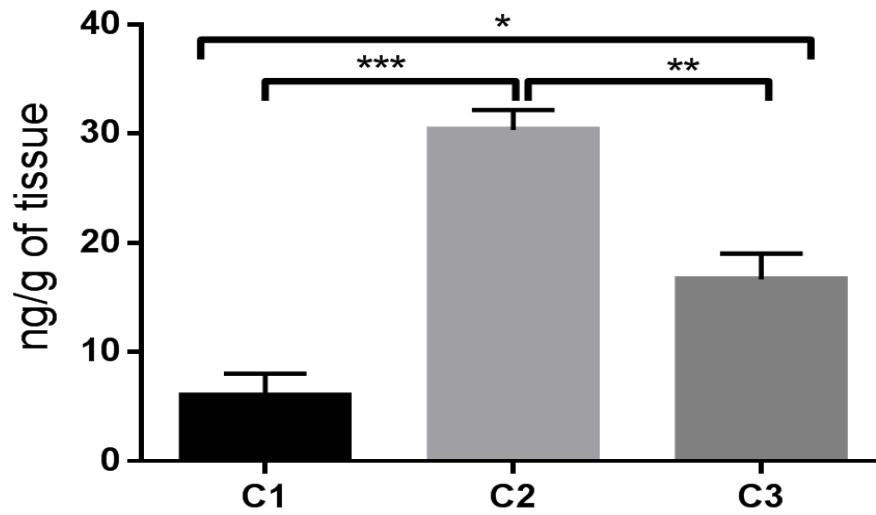


Figure 8.



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou as tarefas de memória de reconhecimento de objetos e de localização de objetos em peixe-zebra. Foi analisada a influência da sinalização glutamatérgica, bem como respostas endócrinas devido ao estresse causado pela habituação nestas tarefas.

A memória é um processo importante para a sobrevivência dos animais que permite a adaptação de seu comportamento diante de novas experiências (Kandel, 2001). Uma série de fatores pode resultar em um déficit de memória, impossibilitando a aquisição e/ou expressão das informações, como por exemplo: hipoglicemia, traumatismos e tumores cerebrais, doenças neurodegenerativas (como a Doença de Alzheimer e demência senil), acidentes cerebrais vasculares, alterações decorrentes de intoxicações e o uso de fármacos (Orzelska-Gorka et al., 2016; Lim e Alexander, 2009; Pike e Savage, 2008; Vakil, 2007). O uso de modelos animais permite a análise do efeito de intervenções farmacológicas ou genéticas sobre sistemas bioquímicos específicos, possibilitando a avaliação do papel desses sistemas na memória (Kapczinski et al., 2000; More et al., 2016).

O peixe-zebra é um modelo animal usado para avaliar características comportamentais complexas humanas, como por exemplo: a capacidade de resposta à recompensa, interação social, agressividade, ansiedade, aprendizado, memória e sono (Norton e Bally-Cuif, 2010). Várias tarefas descritas na literatura foram aplicadas para avaliar os processos de formação da memória, como por exemplo, a memória em labirinto, que se baseia na discriminação espacial (Cognato, 2012; Braidá et al., 2014b; Grossman et al., 2010) e tarefas de esQUIVA INIBITÓRIA (Blank, 2009). No peixe-zebra, a esQUIVA INIBITÓRIA é frequentemente usada para caracterizar o aprendizado associativo, memória de curto e longo prazo e os efeitos da exposição a fármacos (Seibt et al., 2011; Kim et al., 2010; Richetti et al., 2011; Ng et al., 2012; Seibt et al., 2011; Bortolotto et al., 2015)

Para avaliar modelos de amnésia podem ser aplicados diversos testes, entre eles a tarefa de reconhecimento de objeto novo (*novel object recognition* - NOR) (Ennaceur, 2010). A tarefa de reconhecimento de objeto novo pode ser usada para estudar as memórias de curto prazo e longo prazo, através da manipulação de seu intervalo de retenção, isto é, a quantidade de tempo entre o treino e o teste (Tagliabata et al., 2009). Uma grande vantagem deste teste é o fato de não ser necessária a aplicação de motivação externa, recompensa ou punição. A tarefa NOR avalia a capacidade dos animais em reconhecer a substituição de um objeto familiar por um novo objeto em um mesmo ambiente apresentado previamente. Este tipo de memória em peixe-zebra foi estudado anteriormente, onde foram avaliadas a capacidade de discriminação entre objetos e a memória de reconhecimento de objetos. Nos estudos realizados, somente a via de sinalização colinérgica foi avaliada (Braidá et al., 2014a; May, 2016; Faillace et al., 2017), sendo utilizados nicotina para o

melhoramento do desempenho e escopolamina para indução de déficit de memória.

Com base no teste de reconhecimento de objeto, modificações podem ser feitas para avaliar a capacidade dos animais de reconhecerem mudanças na posição específica de objetos dentro de uma arena, caracterizando uma novidade sem que seja necessária a substituição de um objeto. A memória de localização de objetos nos permite lembrar das posições dos objetos em nosso ambiente, sendo um aspecto importante para memória espacial.

O glutamato está envolvido em muitas funções básicas neuronais e processos no sistema nervoso central, especialmente no aprendizado, memória e plasticidade sináptica (Tarabeux et al., 2011). O MK-801 (antagonista não-competitivo dos receptores de NMDA) é um fármaco experimental usado geralmente para estudar a influência da via glutamatérgica em processos comportamentais. Estudos prévios em peixe-zebra demonstram a capacidade de uma indução de déficits de memória em animais tratados com MK-801 na tarefa de memória de labirinto em Y (Cognato et al., 2012) e na tarefa de esQUIVA inibitória (Blank et al, 2009; Seibt et al., 2011).

No Capítulo 2 do presente trabalho, foi analisada primeiramente a preferência inata de cores para determinar os objetos que seriam usados para os demais testes, uma vez que estudos anteriores demonstram que este fator pode ter uma forte influência na escolha para o animal (Faillace et al, 2017). Foi analisado o tempo de exploração de cada um dos objetos e não houve preferência entre os objetos em nenhum dos intervalos de tempo avaliados. Assim, os objetos cubo azul e amarelo foram utilizados para as demais tarefas realizadas neste estudo. Para tarefa de localização de objetos, foi avaliada a preferência inata entre pistas espaciais, pois é necessário o uso destas pistas para que o animal tenha noção da localização do objeto dentro do aparato. O aparato foi coberto externamente em preto e as indicações espaciais ligadas à parte externa do aparelho com a mesma cor e tamanho, conforme realizado em estudos de memória anteriores (Cognato et al., 2012; Braida et al., 2014a), onde a preferência para formas não foi observada. Os resultados não demonstram preferência entre as pistas espaciais (círculo e losango) durante todos os períodos avaliados. Como não houve preferência entre as pistas espaciais avaliadas, estas foram utilizadas para os demais testes de localização de objetos neste estudo.

Na tarefa de reconhecimento de objeto, onde foi avaliado o tempo de exploração de cada um dos objetos (%), foi observada uma preferência do animal em explorar objeto novo em comparação ao objeto familiar, o que está de acordo com estudos anteriores onde o peixe-zebra apresenta um comportamento neofílico (Braida et al., 2014a; Lucon-Xiccato e Dadda, 2014; Pinheiro-da-Silva et al, 2017). Quando avaliamos o efeito do MK-801 na tarefa de reconhecimento de objetos, observamos uma preferência em explorar o objeto familiar pelos grupos controle e MK-801 5 μ M. O grupo tratado com 10 μ M de MK-801 não apresentou preferência entre os objetos, possivelmente devido a um efeito hiperlocomotor causado por este antagonista. Estudos anteriores já

demonstraram que o MK-801 5 μM não altera a locomoção, enquanto que em concentrações maiores de MK-801 é observado um aumento dos parâmetros locomotores (Seibt et al., 2010; 2011). Na tarefa de memória de localização de objetos, foi avaliado o tempo de exploração de cada objeto (%), onde foi observada uma preferência do animal em explorar o objeto na localização nova em comparação ao objeto na localização familiar durante o teste. Hamilton et al. (2016) observaram que, quando o peixe-zebra foi exposto a um objeto familiar em uma localização inicial e a um objeto familiar em uma localização nova, há preferência em explorar o objeto na localização nova. Foi avaliado o efeito do MK-801 na tarefa de localização de objetos e os animais tratados com MK-801 5 ou 10 μM não mostraram diferença significativa na exploração dos objetos. Entretanto, um aumento na distância percorrida foi observado nos animais tratados com 10 μM MK-801. Estes resultados sugerem que o MK-801 prejudicou a formação de memória na tarefa de localização de objetos, o que está de acordo com estudos anteriores que demonstram o déficit cognitivo induzido pelo tratamento com MK-801 (Seibt et al., 2011; Cognato et al., 2012).

Nossos achados mostram alteração no padrão de preferência de objetos entre uma tarefa e outra, pois quando introduzido um elemento novo no protocolo (aquário de tratamento), os resultados de preferência são invertidos. Para avaliar se esta mudança no protocolo seria devido a um fator estressante que influencia na performance durante a tarefa, os animais foram submetidos a três protocolos diferentes chamados de Condição (C1, C2, C3) para avaliar os níveis de cortisol dos animais em situações semelhantes às aquelas em que foram testados previamente. Os resultados mostram níveis maiores de cortisol em animais submetidos à condição C2 e C3 em comparação aos animais submetidos a C1, indicando que os animais submetidos a C2 e C3 apresentam uma maior exposição ao estresse. Tais resultados demonstram que altos níveis de cortisol podem afetar o desempenho durante as tarefas de memória de reconhecimento e de localização de objetos. Este estudo demonstra que essas tarefas são sensíveis à manipulação experimental, o que sugere que a memória testada é lábil em peixe-zebra. Portanto, nossos achados sugerem que a condição C1, que não envolve manipulação experimental, é o protocolo mais adequado para avaliar as memórias de reconhecimento e localização de objeto. Desta forma, o uso dessas tarefas pode ser limitado devido à sensibilidade ao estresse causado pela manipulação experimental, o que pode prejudicar o desenvolvimento de estudos farmacológicos.

Este estudo demonstra que as tarefas de reconhecimento de objeto novo e localização de objetos são promissoras para avaliar a memória em diferentes condições fisiológicas e patológicas e que a sinalização glutamatérgica pode estar relacionada com o processamento da memória de localização de objetos.

5. REFERÊNCIAS

- Aggleton JP, Albasser MM, Aggleton DJ, Poirier GL, Pearce JM. Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. *Behav Neurosci.* 2010; 124: 55–68.
- Albasser MM, Davies M, Futter JE, Aggleton JP. Magnitude of the object recognition deficit associated with perirhinal cortex damage in rats: effects of varying the lesion extent and the duration of the sample period. *Behav Neurosci.* 2009; 123: 115–124.
- Alderman SL, Bernier NJ. Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* 2009;164(1):61–9.
- Alsop D, Vijayan M. The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. *Gen Comp Endocrinol* 2009;161(1):62–6.
- Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.* 2012; 13: 93–110.
- Bailey JM, Oliveri AN, Levina ED. Pharmacological analyses of learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol Biochem Behav.* 2015; 139: 103–111.
- Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2009; 92: 529–34.
- Baxter MG. “I’ve seen it all before”: explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical Comment on Burke et al. *Behav Neurosci.* 2010; 124: 706–709.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LRM, Izquierdo I and Medina JH. Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF-Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron.* 2007; 53: 261–277.
- Bortolotto JW, Melo GM, Cognato Gde P, Vianna MR, Bonan CD. Modulation of adenosine signaling prevents scopolamine-induced cognitive impairment in zebrafish. *Neurobiol Learn Mem.* 2015; 118: 113–9.
- Braida D, Ponzoni L, Martucci R, Sala M. A new model to study visual attention in zebrafish, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2014a; 55: 80–86.
- Braida D, Ponzoni L, Martucci R, Sparatore F, Gotti C, Sala M. Role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) on learning and memory in zebrafish. *Psychopharmacology (Berl).* 2014b; 231:1975–85.
- Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem.* 2010; 17: 5–11.
- Buckmaster CA, Eichenbaum H, Amaral DG, Suzuki WA, Rapp PR. Entorhinal cortex lesions disrupt the relational organization of memory in monkeys. *J Neurosci.* 2004; 24: 9811–9825.
- Bury NR, Sturm A. Evolution of the corticosteroid receptor signalling pathway in fish. *Gen Comp Endocrinol* 2007;153(1–3):47–56.

Clark RE, Zola SM, Squire LR. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci.* 2000; 20: 8853–8860.

Clarke JR, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I, Delgado-García JM. Plastic modifications induced by object recognition. *PNAS* 2010; 107: 2652–2657.

Cognato G de P, Bortolotto JW, Blazina AR, Christoff RR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Y-Maze memory task in zebrafish (*Danio rerio*): the role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods. *Neurobiol Learn Mem.* 2012; 98: 321–8.

CONCEA – Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, 2013. Disponível em: <file:///C:/Users/D%C3%A9bora/Downloads/DIRETRIZES%20DA%20PR%C3%81TICA%20DE%20EUTAN%C3%81SIA%20DO%20CONCEA.pdf> Acesso em: 10 maio de 2016.

Costa-Mattioli M, Sonenberg N. Translational control of gene expression: a molecular switch for memory storage. *Prog. Brain Res.* 2008; 169: 81–95.

Crane J, & Milner B. What went where? Impaired object-location learning in patients with right hippocampal lesions. *Hippocampus.* 2005; 15:217–231.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 1999; 51:7–61.

Engeszer RE, Patterson LB, Rao AA, Parichy DM. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish.* 2007; 4: 21–40.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1. Behavioral data. *Behav Brain Res.* 1988; 31:47–59.

Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res.* 2010; 215: 244–254.

Faillace MP, Pisera-Fuster A, Medrano MP, Bejarano AC, Bernbeu RO. Short- and long-term effects of nicotine and the histone deacetylase inhibitor phenylbutyrate on novel object recognition in zebrafish. *Psychopharmacology.* 2017; 234:943–955

Febo M and Foster TC. Preclinical Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy Studies of Memory, Aging, and Cognitive Decline. *Front. Aging Neurosci.* 8:158.

Fellini L, Florian C, Courtney J, Roulet P. Pharmacological intervention of hippocampal CA3 NMDA receptors impairs acquisition and long-term memory retrieval of spatial pattern completion task. *Learn. Mem.* 2009; 16: 387–394.

Fetcho JR, McLean DL. Some principles of organization of spinal neurons underlying locomotion in zebrafish and their implications. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1198:94–104

Gaskin S, Tardif M, Cole E, Piterkin P, Kayello L, Mumby DG. Object familiarization and novel-object preference in rats. *Behav Proc.* 2010; 83:61–71.

Gerlai, R., Fish in behavior research: unique tools with a great promise! *J. Neurosci.* 2014; *Methods* 234, 54–58.

Goulart BK, de Lima MNM, de Farias CB, Reolon GK, Almeida VR, Quevedo J, Kapczinski F, Schroder N, Roesler R. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*. 2010; 167: 969–973.

Graeff FG, et al. *Neurobiologia das doenças mentais*. São Paulo: Lemos Editorial, 1999.

Grossman L, Utterback E, Stewart A, Gaikwad S, Chung KM, Suci C, et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav Brain Res*. 2010; 214: 277–84.

Hammond RS, Tull LE, Stackman RW. On the delay dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2004; 82:26–34.

Hannula DE, & Ranganath C. Medial temporal lobe activity predicts successful relational memory binding. *The Journal of Neuroscience*. 2008; 28:116–124.

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci*. 2006; 29: 496–505.

Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*. 2001; 294: 1030–1038.

Kapczinski F, et al. *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

Kesner RP. The posterior parietal cortex and long-term memory representations of spatial information. *Neurobiol Learn Mem*. 2009; 91:197–206.

Kessels RPC, Kappelle LJ, & de Haan EHF. Lateralization of spatial memory processes: Evidence on spatial span, maze learning, and memory for object locations. *Neuropsychologia*. 2002; 40:1465–1473

Kim YH, Lee Y, Kim D, Jung MW, Lee CJ. Scopolamine-induced learning impairment reversed by physostigmine in zebrafish. *Neurosci Res*. 2010; 67: 156–61.

Kirsten K, Fior D, Kreutz LC, Barcellos LJG. First description of behavior and immune system relationship in fish. *Sci Rep*. 2018;8(1):846.

Köles L, Kató E, Hanuska A, Zádori ZS, Al-Khrasani M, Zelles M, Rubini P, Illes P. Modulation of excitatory neurotransmission by neuronal/glia signaling molecules: interplay between purinergic and glutamatergic systems. *Purinergic Signalling*. 2016; 12: 1–24.

Korinek M, Kapras V, Vyklicky V, Adamusova E, Borovska J, Vales K, Stuchlik A, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L Jr. Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids*. 2011; 76: 1409–1418.

Kuang X, Zhou S1, Guo W, Wang Z, Sun Y, Liu H. SS-31 peptide enables mitochondrial targeting drug delivery: a promising therapeutic alteration to prevent hair cell damage from aminoglycosides. *Drug Deliv*. 2017;24(1):1750-1761.

Lei Arouca, Lei nº 11.794, de outubro de 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/L11794.htm> Acesso em: 19 de maio de 2016.

Lewerenz J, Maher P. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? *Front. Neurosci.* 2015; 9:469.

Lim C, Alexandre MP. Stroke and episodic memory disorders. *Neuropsychologia.* 2009; 47: 3045–3058.

Lucon-Xiccato T, Dadda M. Assessing memory in zebrafish using the one-trial test. *Behav. Processes.* 2014; 106: 1–4.

Lüscher C, Nicoll RA, Malenka RC, Muller D. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci.* 2000; 3: 545–550.

Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate CA. The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology and therapeutics of mood disorders. *Neuroscientist.* 2009; 15: 525–539.

Malkova L, Mishkin M. One-trial memory for object-place associations after separate lesions of hippocampus and posterior parahippocampal region in the monkey. *J. Neurosci.* 2003; 23: 1956–1965.

Markowitsch HJ. Varieties of memory systems, structures, mechanisms of disturbance. *Neurol Psychiat Brain Res.* 1997; 2: 49-68.

Markram K, Gerardy-Schahn R, Sandi C. Selective learning and memory impairments in mice deficient for polysialylated NCAM in adulthood. *Neuroscience.* 2007; 144: 788–796.

May Z, Morrill A, Holcombe A, Johnston T, Gallup J, Fouad K, Schalomon M, Hamilton TJ. Object recognition memory in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2016; 296: 199–210.

Milner AD, & Goodale MA. *The visual brain in action.* Oxford University Press. 1995.

Moore SJ, Deshpande K, Stinnett GS, Seasholtz AF, GG, Murphy, Conversion of short-term to long-term memory in the novel object recognition paradigm, *Neurobiol. Learn. Mem.* 2013; 105: 174–185.

More SV, Kumar H, Cho DY, Yun YS, Choi DK. Toxin-Induced Experimental Models of Learning and Memory Impairment. *Int J Mol Sci.* 2016 Sep 1;17(9).

Moscovitch M, Kapur S, Kohler S, & Houle S. Distinct neural correlates of visual long-term memory for spatial location and object identity: A position emission tomography study in humans. *PNAS* 1995; 92,: 3721–3725.

Mumby DG, Glenn MJ, Nesbitt C, Kyriazis DA. Dissociation in retrograde memory for object discriminations and object recognition in rats with perirhinal cortex damage. *Behav Brain Res.* 2002; 132: 215–226.

Myskiw JC, Fiorenza NG, Izquierdo LA, Izquierdo I. Molecular mechanisms in hippocampus and basolateral amygdala but not in parietal or cingulate cortex involved in extinction of one-trial avoidance learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2010; 94: 285–91.

- Nam RH, Kim W, Lee CJ. NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the telencephalon of the zebrafish. *Neurosci Lett*. 2004 Nov 11;370(2-3):248-51.
- Ng MC, Hsu CP, Wu YJ, Wu SY, Yang YL, Lu KT. Effect of MK-801-induced impairment of inhibitory avoidance learning in zebrafish via inactivation of extracellular signal regulated kinase (ERK) in telencephalon. *Fish Physiol Biochem* 2012; 38: 1099–106.
- Norton W, Bally-Cuif L. Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neurosci*. 2010; 11: 90.
- Olive R, Wolf S, Dubreuil A, Bormuth V, Debrégeas G and Candelier R. Rheotaxis of Larval Zebrafish: Behavioral Study of a Multi-Sensory Process. *Front. Syst. Neurosci*. 2016; 10:14.
- Oliveira AMM, Hawk JD, Abel T, Havekes R. Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learn Mem*. 2010; 17:155–160.
- Oliveira J, Silveira M, Chacon D, Luchiari A. The zebrafish world of colors and shapes: preference and discrimination. *Zebrafish*. 2015 Apr;12(2):166-73.
- Okujava V, Natishvili T, Mishkin M, Gurashvili T, Chipashvili S, Bagashvili T, Kvernadze G. One-trial visual recognition in cats. *Acta Neurobiol. Exp*. 2005; 65: 205–211.
- Orzelska-Gorka J, Talarek S, Listos J, Kedzierska E, Fidecka S. L-NAME differential effects on diazepam and flunitrazepam responses of rats in the object recognition test. *Pharmacol Rep*. 2016; 68: 728–732.
- Panula P, Chen YC, Priyadarshini M, Kudo H, Semenova S, Sundvik M, Sallinen V. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of *zebrafish* CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis*. 2010; 40: 46-57.
- Pertzov Y, Miller TD, Gorgoraptis N, Caine D, Schott JM, Butler C, Husain M. Binding deficits in memory following medial temporal lobe damage in patients with voltage-gated potassium channel complex antibody-associated limbic encephalitis. *Brain*. 2013; 136: 2474–2485.
- Piato ÂL, Capiotti KM, Tamborski AR, Oses JP, Barcellos LJ, Bogo MR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(2):561-7.
- Piekema C, Kessels RPC, Mars RB, Petersson KM, & Fernández G. The right hippocampus participates in short-term memory maintenance of object location associations. *Neuroimage*. 2006; 33:374–382.
- Pike KE, and Savage G. Memory profiling in Mild Cognitive impairment: can we determine risk for Alzheimer's disease. *J.Neuropsychol*. 2008; 2: 361–372.
- Pinheiro-da-Silva J, Silva PF, Nogueira MB, Luchiari AC. Sleep deprivation effects on object discrimination task in zebrafish (*Danio rerio*) *Anim Cogn* (2017) 20:159–169.
- Pittenger C. Disorders of memory and plasticity in psychiatric disease *Dialogues Clin Neurosci*. 2013; 15: 455-463.

- Portavella M, Vargas JP, Torres B, Salas C. The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. *Brain Res Bull* 2002; 57: 397–9.
- Rebola N, Srikumar BN, Mulle. C. Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J Physiol.* 2010; 588: 93–99.
- Rendeiro C, Spencer JP, Vauzour D, Butler LT, Ellis JA, Williams CM, The impact of flavonoids on spatial memory in rodents: from behaviour to underlying hippocampal mechanisms, *Genes & Nutrition.* 2009; 4: 251–270.
- Richetti SK, Blank M, Capiotti KM, Piato A L, Bogo MR, Vianna MR, et al. Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2010; 217: 10–15.
- Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. *Zebrafish* neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol.* 2011; 33: 608-17.
- Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff EL, Martin SJ, Bridge H, de Hoz L, Poeschel B, McCulloch J, Morris RG. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nature Neurosci.* 1999; 2: 898–905.
- Rodríguez-Moreno A, Sihra TS. Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *J Neurochem.* 2007; 103:2121–2135.
- Roesler R, Roozendaal B, McGaugh JL. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training. *Eur J Neurosci.* 2002; 15: 905–910.
- Sarkisyan G, Hedlund PB. The 5-HT7 receptor is involved in allocentric spatial memory information processing. *Behav Brain Res.* 2009; 202:26–31.
- Seibt KJ, Piato AL, da Luz Oliveira R, Capiotti KM, Vianna MR, Bonan CD. Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 2011;224:135–9.
- Shafritz KM, Gore JC, & Marois R. The role of the parietal cortex in visual feature binding. *PNAS.* 2002; 99:10917–10922.
- Silvers JM, Harrod SB, Mactutus CF, Booze RM. Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. *J Neurosci Met.* 2007; 166:99–103.
- Smith CN, Frascino JC, Hopkins RO, Squire LR. The nature of anterograde and retrograde memory impairment after damage to the medial temporal lobe. *Neuropsychologia.* 2013; 51: 1-15.
- Sommer T, Rose M, Weiller C, & Buchel C. Contributions of occipital, parietal and parahippocampal cortex to encoding of object-location associations. *Neuropsychologia.* 2005; 43:732–743.
- Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis of findings with rats, monkeys and humans, *Psychol Rev.* 1992; 99: 195-221.

Tagliabattola G, Hogan D, Zhang WR, Dineley KT. Intermediate and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition. *Behav Brain Res.* 2009; 200: 95–99.

Tarabeux J, Kebir O, Gauthier J, Hamdan FF, Xiong L, Piton A, Spiegelman D, Henrion É, Millet B, S2D team, Fathalli F, Joobor R, Rapoport JL, DeLisi LE, Fombonne É, Mottron L, Forget-Dubois N, Boivin M, Michaud JL, Drapeau P, Lafrenière RG, Rouleau GA, Krebs MO. Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 2011; 1: 55.

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev.* 2010; 62: 405–496.

Vakil E. The effect of moderate to severe Traumatic Brain Injury (TBI) on different aspects of memory: a selected review. *J.Clin.Exp.Neuropsychol.* 2007; 27: 977–1021.

Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, Kaniakova M, Lichnerova K, Cerny J, Krusek J, Dittert I, Horak M, Vyklicky L. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res.* 2014; 63: 191–203.

Westerfield M. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio).* Eugene: university of Oregon Press, 2000. Disponível em: <http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html> Acesso em: 20 de maio de 2016.

Winters B., Saksida LM, Bussey TJ. Implications of animal object memory research for human amnesia, *Neuropsychologia.* 2010; 48: 2251–2261.

Woldemichael BT, Bohacek J, Gapp K, Mansuy IM. Epigenetics of memory and plasticity. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014; 122:305-40.

Zheng H, Bieri KW, Hwaun E, Colgin LL. Fast Gamma Rhythms in the Hippocampus Promote Encoding of Novel Object–Place Pairings. *New Research.* 2016; 3: 1-19.

Zola SM, Squire LR, Teng E, Stefanacci L, Bufallo EA, Clark RE. Impaired recognition memory in monkeys after damage limited to the hippocampal region, *J. Neurosci.* 2000; 20: 451–463.

6. ANEXO



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7574

Porto Alegre, 23 de novembro de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Memória de reconhecimento e localização de objetos em peixe-zebra (*Danio rerio*): Papel da sinalização mediada por adenosina" coordenado por CARLA DENISE BONAN.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
2496	peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)	23/11/2016 - 23/05/2018

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)