



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada

Laboratório de Neurociências

**Avaliação da expressão de genes da via TOR durante a consolidação da memória
em zebrafish (*Danio rerio*) de diferentes idades**

Carolina da Silva Peixoto

Dissertação defendida no âmbito do programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE em Fisiologia Animal Comparada.

Orientadora Prof^ª Dr^ª Daniela Martí Barros

Rio Grande, agosto de 2014

[...] Para que se vea desde alta mar
de poco le sirve al navegante
que no sepa esperar.

Pie detrás de pie
no hay otra manera de caminar
la noche del Cabo
revelada en un inmenso radar.

Un faro para, sólo de día,
guía, mientras no deje de girar
no es la luz lo que importa en verdad
son los 12 segundos de oscuridad.

12 Segundos de Oscuridade – Jorge Drexler

Agradecimentos

Há dois anos atrás, quando ingressei no mestrado, não fazia idéia de quantos braços, cérebros e corações eram necessários para desenvolver este trabalho e chegar ao fim da caminhada. Mais uma vez, percebi que na vida caminhamos juntos, lado a lado, e chegamos muito mais longe quando não estamos sozinhos. Hoje, sei que me tornei melhor como profissional e ser humano, depois deste tempo de aprendizado e trabalho. Por isso, este espaço vai ser a minha oportunidade de agradecer todos aqueles que estiveram comigo durante este período. E neste balanço que fazemos no fim de uma etapa, me dei conta de que sou muito abençoada, pois tive o prazer de encontrar pessoas maravilhosas. Então, gostaria de agradecer...

À Universidade Federal do Rio Grande, por ter me acolhido em 2008, me formado bióloga, professora, e por fim, me dado a oportunidade de realização deste mestrado;

Às agências de fomento CAPES e CNPq, que proporcionaram a realização deste trabalho;

Ao Instituto de Ciências Biológicas, ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada e todos os professores e funcionários que estiveram sempre disponíveis e dispostos a ajudar em qualquer que fosse a dúvida ou questão que eu precisasse. Gostaria de deixar registrado aqui meu agradecimento especial aos professores Elton Colares, por me ajudar a pensar sobre os experimentos de comportamento me disponibilizando material para filmagem e Luis Eduardo Maia Nery, por ter sido sempre uma grande inspiração e exemplo de pesquisador, professor e cientista, me ajudando a pensar da forma mais científica possível sobre os aspectos do meu trabalho;

Ao professor Luiz Fernando Marins, que esteve presente na minha caminhada acadêmica desde o primeiro ano da graduação, me encorajou a procurar por aquilo que me provoca “brilho nos olhos” e serviu como exemplo de pesquisador que é apaixonado por aquilo que escolheu fazer. Obrigada por deixar as portas do Laboratório de Biologia Molecular sempre abertas para mim e por aceitar ser banca examinadora desta dissertação;

Ao professor Maurício Bogo, por ter aceitado participar desta defesa de dissertação e contribuir com a construção deste trabalho;

À professora Daniela Barros, por ter me acolhido no Laboratório de Neurociências com o amor e carinho que sabes dar, pela confiança depositada em mim e

todo apoio que me ofereceu nos momentos de dificuldade. Dani, levarei para sempre comigo os ensinamentos que me deste, obrigada!

Aos colegas do LabNeuro, que formam mais do que um grupo de pesquisa, mas que foram, para mim, um grupo de amigos e companheiros que levarei sempre nas melhores memórias. Agradeço em especial ao Gustavo, que insistiu em me dizer que eu deveria conversar com a Dani pois eu tinha a “vibe do laboratório”. Agradeço, por ter sido o meu coorientador não oficial, me ajudou muito mesmo estando muitos km longe e teve paciência e trabalho de me ajudar sempre que eu precisei. Gusta, espero te ver muito feliz na pesquisa, pois sei que tens o potencial de trilhar por caminhos brilhantes!

À colega e amiga Lidiane, que me mostrou como o esforço e a dedicação podem frutificar belos trabalhos e esteve sempre presente durante esta jornada, desejo pra ti muito sucesso também, pois és merecedora;

À Gisele, minha fiel companheira dos trabalhos com *zebrafish*, que me acolheu como se eu fosse a irmã mais nova que ela não teve. Ensinou-me de questões farmacêuticas à como ter menos rugas! Gi, és a pessoa mais altruísta que conheci até hoje, e espero ter conseguido aprender a ser um pouquinho assim também. Obrigada por não medir esforços para me ajudar em absolutamente tudo que eu precisei e ser essa pessoa amiga e companheira, que me ajuda a ver a vida de diferentes ângulos;

Aos alunos de Iniciação Científica Eduardo, Jaderson e Arthur, que foram tão responsáveis e dedicados durante o trabalho no laboratório. Sem vocês eu não teria conseguido realizar este trabalho. Muito obrigada!

Aos colegas de pós graduação que dividem o espaço e as experiências de ser um pós graduando, estimulando, aconselhando e se divertindo durante os dias de trabalho. Em especial gostaria de deixar meu muito obrigada para o Márcio Geihs, és sempre um amigo querido e que sabe ajudar a resolver qualquer problema; a Cássia, que dividiu comigo a representação discente e foi muitas vezes mais do que colega; a Roberta Socoowski, por ter se tornado uma amiga tão querida, por aceitar trabalhar comigo a qualquer hora para que as coisas dessem certo, e por divertir tanto os meus dias de trabalho; ao Bruno Oliveira, uma pessoa muito especial para mim, que além de me ajudar na fisiologia, não me deixa esquecer de coisas tão importantes na minha vida, como a fé; ao amigos Bruno Cruz, Cristiane e Dérien, que mesmo mais de longe estão sempre prontos a me lançar um sorriso quando nos encontramos e me dão tanto carinho, amizade e apoio;

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular, que estão sempre prontos para ajudar com paciência e tranquilidade. Em especial, meu profundo agradecimento a

Ana Lupe, que dividiu conhecimentos sobre os comportamentos de zebrafish e viagens por Minas Gerais; e Daniela Volcan, por ter sido tão dedicada em me ajudar quando mais precisei, mesmo tendo a sua vida preenchida pelo amor de carregar a Joana no ventre. Obrigada por me sorrir e dizer “vai ficar ótimo” quando o desespero chegava. Dani, obrigada por me acolher e ter sido tão amável e companheira!

Às minhas queridas amigas Carolina e Maiara. Nem existem palavras que possam descrever o quanto vocês são especiais na minha vida. Obrigada por terem sido quem vocês são, com as qualidades e defeitos, e terem aceitado dividir a jornada de vocês comigo. Se hoje sou uma pessoa melhor do que a 6 anos atrás, é porque tive vocês comigo. Muito, muito obrigada!

Ao meu amigo, namorado, amor Yuri, por ser essa pessoa espontânea, sensata, corajosa e especial, que me ensina a ser cada dia melhor, mais forte e feliz. Obrigada por ter estado comigo durante esta caminhada me apoiando e me fazendo lembrar que sou mais forte do que imagino. Eu te amo!

À minha família, por ser meu verdadeiro e eterno “continente”, por estarem ao meu lado, caminhando comigo, acreditando nos meus sonhos e me fazendo lembrar sempre do que é realmente valioso nesta existência. Obrigada pai e mãe por terem dedicado tanto amor, carinho, respeito, me dando oportunidade de crescer e ser feliz. Obrigada mana, por me dar a segurança de saber que vais estar sempre pronta a me acolher no teu amor e ter me dado a chance de sentir o amor e felicidade de ser dinda do Bê. Amo vocês!

E por fim, a toda essa grande e poderosa energia de amor que nos guia, que alguns chamam de Deus, e que eu sinto presente sempre no meu coração e no meu espírito durante esta vida.

Muito obrigada!

Sumário

Resumo geral	vii
Lista de abreviaturas	viii
Lista de figuras	ix
1. Introdução geral.....	1
1.1 Memória.....	1
1.2 Síntese proteica e controle traducional	4
1.3 Proteína TOR	6
1.4 Zebrafish como modelo biológico	10
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
MANUSCRITO.....	15
Abstract.....	17
1. INTRODUCTION.....	18
2. MATERIALS AND METHODS	19
2.1 Animals and maintenance	19
2.2 Behavioral tasks	20
2.2.1 Open field.....	20
2.2.2. Inhibitory avoidance task	20
2.3 Gene expression	21
2.4 Statistical analysis	22
3. RESULTS.....	22
4. DISCUSSION	25
5. REFERENCES	28
Figures and captions	31
3. Considerações finais	37
4. Referências	38

Resumo geral

A síntese protéica é um evento chave para a formação de memórias de longa duração, e muitos estudos vem investigando quais vias de sinalização intracelular estão envolvidas neste processo. Sabemos também, que ao longo do envelhecimento, os processos básicos de manutenção das funções celulares vão ficando mais lentos e podem apresentar problemas, gerando patologias. Uma das vias de controle da síntese protéica é a via que inclui a proteína TOR, que de maneira geral regula o processo traducional. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os padrões de expressão de genes relacionados a promoção da síntese protéica durante a consolidação da memória em *zebrafish* (*Danio rerio*) jovens, adultos e velhos. Para isso, os animais foram submetidos ao protocolo de treino na esquivia inibitória, seguida da retirada de tecido cerebral 30 min, 3 h e 6 h após o treino, para avaliação de expressão gênica de BDNF, TOR e dois de seus alvos (eIF4E-BP e p70S6K) em RT-PCR. Os resultados deste trabalho mostram que há diferenças entre o padrão de expressão gênica entre os animais de diferentes idades. Mas, todos os grupos demonstram um aumento na expressão de BDNF nas fases iniciais da consolidação da memória, persistindo até 6 h após o treino. Este resultado ocorreu tanto nos animais submetidos ao choque, quanto nos animais que apenas entraram no aparato. Isso nos leva a pensar que tanto o aprendizado aversivo, quanto a exposição ao novo ambiente desencadeiam respostas de plasticidade sináptica nestes animais. Além disso, a expressão gênica da TOR e suas duas principais efetoras (4E-BP e p70S6K) manteve os mesmo padrão de aumento que BDNF nas três diferentes idades, sugerindo que esta via está ligada a plasticidade sináptica em *zebrafish*.

Palavras chave: *zebrafish*, memória, envelhecimento, TOR.

Lista de abreviaturas

4E-BP – proteína de ligação do fator de iniciação eucariótico 4E

5' TOP – 5' tract of oligopyrimidine

AMPA - receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

CaMKII – proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina II

CREB – elemento de resposta ao cAMP

DNA – ácido desoxirribonucleico

dpf – dias pós fertilização

eIF4A – fator de iniciação eucariótico 4A

eIF4B - fator de iniciação eucariótico 4B

eIF4G - fator de iniciação eucariótico 4G

eIFs – fatores de iniciação eucarióticos

ERK – proteína cinase regulada por sinais extracelulares

hpf – horas pós fertilização

LTP – potenciação de longa duração

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

NMDA – receptor N-metil-D-aspartato

PKA – proteína cinase A

PKC – proteína cinase C

PKG – proteína cinase G

RNA – ácido ribonucleico

Rp113 – proteína ribossomal 113

TOR – alvo da rapamicina

TORC1 – alvo da rapamicina – complexo 1

TORC2 – alvo da rapamicina – complexo 1

Lista de figuras

Figura 1: Mecanismos de formação da memória de longa duração em CA1	2
Figura 2: Mecanismos que regulam a tradução na memória de longa duração	3
Figura 3: Possíveis mecanismos celulares de regulação gênica	4
Figura 4: Ação da proteína TOR sobre o fator de iniciação 4E-BP	8
Figura 5: Ação da proteína TOR sobre o fator de iniciação 4E-BP e a proteína S6K formando um complexo com a fita de mRNA	8
Figura 6: Estágios do desenvolvimento de <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>)	11

1. Introdução geral

1.1 Memória

Ao longo da evolução, os organismos vivos foram submetidos a diferentes condições ambientais, precisando lançar mão de diferentes estratégias para garantir sua sobrevivência e perpetuação da espécie. Uma das estratégias a se destacar é a capacidade de modificar o comportamento em função de experiências vivenciadas, podendo assim, distinguir ações que beneficiam ou não a continuidade da vida. Dessa forma, a memória é a maneira de um organismo armazenar e codificar informações em seu sistema nervoso central, permitindo assim, interações com o ambiente (Kandel, 2001; Squire & Kandel, 2003).

Conforme o animal registra suas diferentes experiências ao longo da vida, vai criando uma intrincada rede de conexões eletroquímicas entre neurônios, provocando alterações estruturais e funcionais em suas estruturas sinápticas (Kandel, 2001; Bailey *et al.*, 2008). Para que novas redes de conexões sejam formadas, é preciso que eventos bioquímicos aconteçam nas redes neurais que foram ativadas pelo aprendizado. Assim, uma cascata sinalizadora é ativada no interior da célula, culminando com a síntese de novas proteínas. Esses eventos são conhecidos como potenciação de longa duração (LTP) ou como consolidação, e são importantes para a formação de memórias de longa duração (Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 2006).

Para estudar como uma resposta é aprendida, é preciso entender como uma memória de longa duração é formada. Para isso, um protocolo bem aceito é aquele em que o animal é submetido a um único evento aversivo e aprende a evitar o perigo em apenas um julgamento (em inglês, *one-trial avoidance learning*) (Lucon-Xiccato & Dadda, 2014). Muitos estudos revelaram que a região CA1 do hipocampo é fundamental para a formação de uma memória de longa duração (Izquierdo *et al.*, 2006) e está

conectada a outras regiões do cérebro como septo medial, cortex entorrinal e, através deste, com a amígdala e outras regiões do córtex. (Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 2006). Durante a consolidação de uma memória, receptores de glutamato AMPA, NMDA e receptores metabotrópicos se ativam na região CA1 do hipocampo aumentando a concentração de cálcio no interior no neurônio. O aumento da concentração de cálcio intracelular é o gatilho para ativação de proteínas cinases como CaMKII, PKC, PKG, PKA e ERKs (Izquierdo & Medina, 1997; Malenka & Nicolli, 1999; Izquierdo *et al.*, 2006).

A atividade cinase da PKG é importante para o início da LTP, participando da liberação de óxido nítrico, monóxido de carbono e o fator de ativação plaquetário, substâncias que aumentam a liberação de glutamato, melhorando a eficiência da sinapse nos primeiros minutos. Para a liberação de glutamato do neurônio pré sináptico, a PKC também é importante pois fosforila a proteína GAP-43, envolvida na mobilização de vesículas de glutamato. Em neurônios pós sinápticos, as proteínas CaMKII e PKC funcionarão fosforilando receptores glutamatérgicos a ativando-os. A atividade de CaMKII em receptores AMPA por exemplo, dura muitas horas após o início da potenciação de longa duração (Izquierdo & Medina, 1997; Malenka & Nicolli, 1999; Izquierdo *et al.*, 2006). As proteínas ERK e a PKA atuam principalmente na fosforilação de fatores de transcrição como o CREB, que participa da sinalização que leva à síntese de novas proteínas (O’Connell *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 2006) (Figura 1).

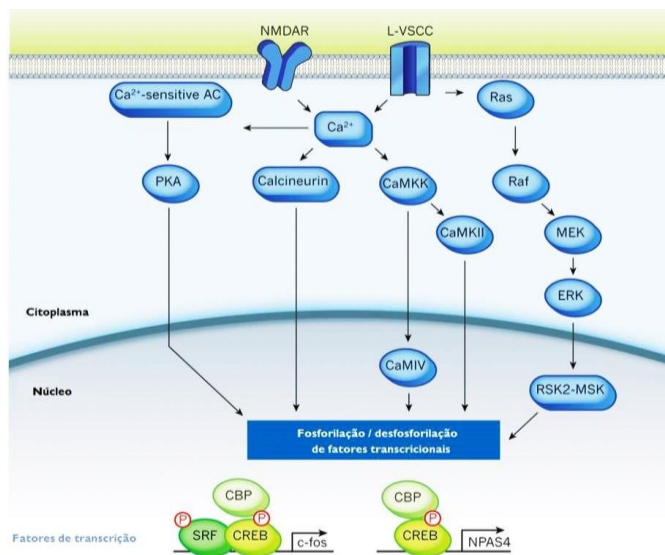


Figura 1: Mecanismos de formação da memória de longa duração. Adaptado de Ebert & Greenberg (2013).

A partir da ativação destas cascatas sinalizatórias, o controle transcricional passa a ser regulado envolvendo as vias das proteínas Akt, PI3K e MER/ERK. Um dos alvos finais destas cascatas sinalizatórias que iniciam com o influxo de cálcio e ativação de receptores de membrana é a proteína TOR. Uma vez ativada, a TOR participará do ajuste da maquinaria de síntese protéica (Garelick & Kennedy, 2011) (Figura 2).

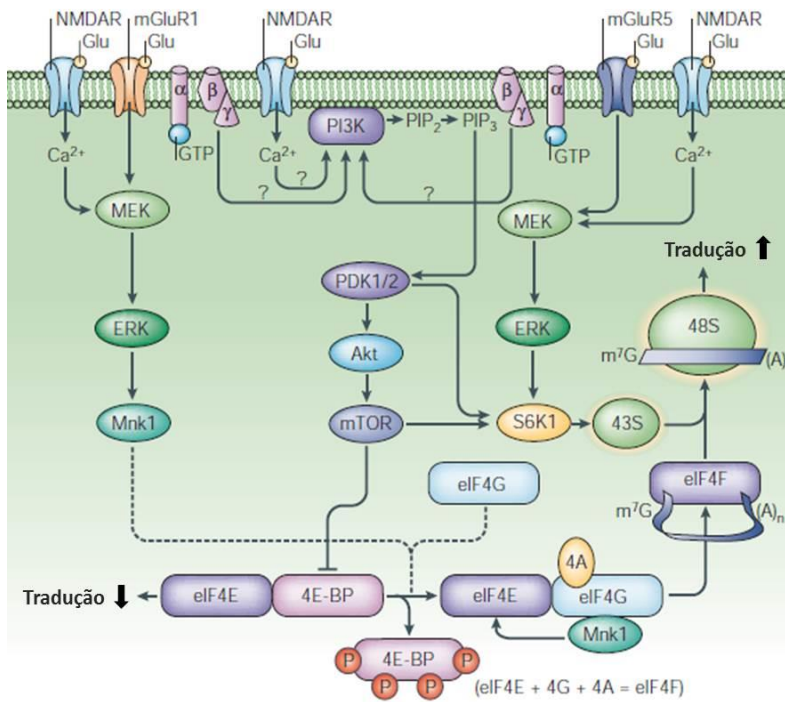


Figura 2: Mecanismos regulatórios de tradução na memória de longa duração. Adaptado de Klann & Dever (2004).

Sendo assim, a consolidação de memória requer um rearranjo molecular e estrutural das espinhas dendríticas como mostra Lamprecht & LeDoux (2004) (Fig. 3). A partir do potencial de ação, o influxo de cálcio e ativação de vias que culminarão na síntese de proteínas ocorrem no interior do neurônio e iniciam uma série de modificações estruturais como: aumento no número de vesículas contendo neurotransmissores nos neurônios pré sinápticos, aumento no número de receptores de membrana nos neurônios pós sinápticos, aumento no número de ribossomos nos neurônios pós sinápticos. Ao longo do tempo, novas espinhas dendríticas são formadas, aumentando assim a capacidade de transmissão da via que está sendo ativada, tornando-

a mais forte. Esse fenômeno pode ser chamado de plasticidade sináptica, processo no qual a síntese protéica é essencial (Lamprecht & LeDoux, 2004).

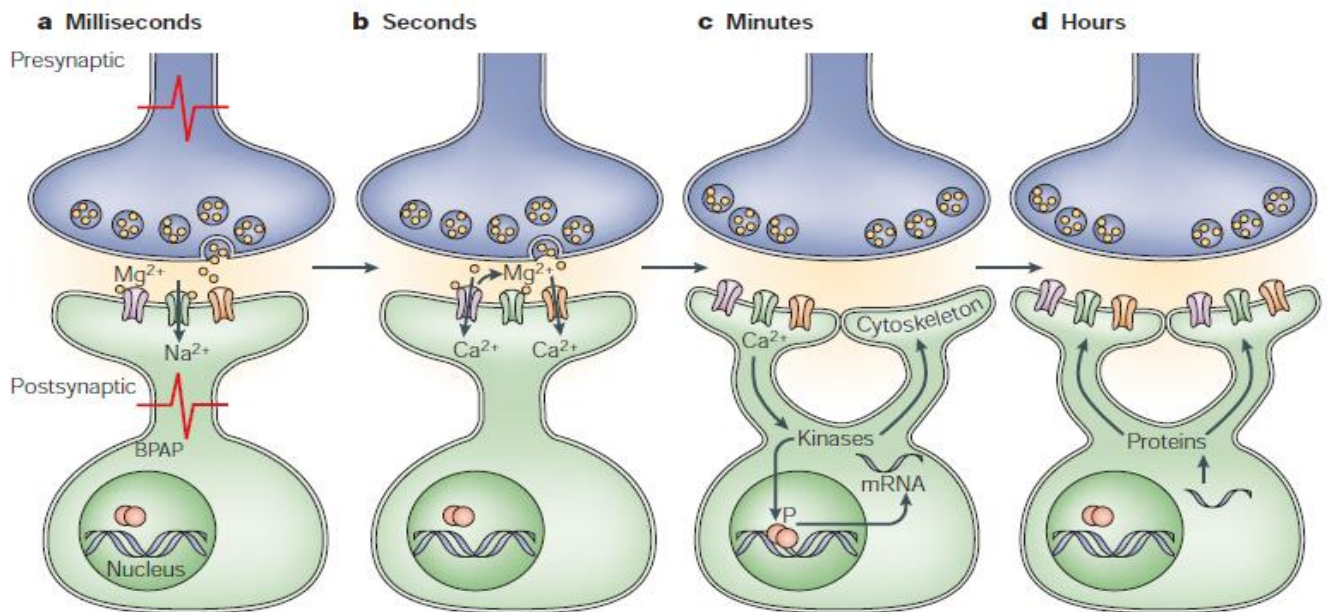


Figura 3: Mecanismos moleculares envolvidos no processo de plasticidade sináptica. Adaptado de Lamprecht & LeDoux (2004).

1.2 Síntese protéica e controle traducional

Para que a informação contida em um gene direcione a síntese de uma proteína, são necessários muitos passos, sendo cada um deles crucial na formação de uma nova molécula protéica. Em eucariotos, o primeiro passo é realizado pelas RNA polimerases e uma série de outras proteínas denominadas fatores gerais de transcrição. Essas moléculas reconhecem sítios promotores do DNA e transcrevem seqüências gênicas em fitas de RNA complementar. A fita de RNA mensageiro (mRNA) poderá, então, ser traduzida nos ribossomos presentes no citoplasma celular (Dever *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2010)

Para isso, uma extensa e complexa maquinaria entra em funcionamento, incluindo as subunidades ribossomais, a fita de mRNA, uma série de fatores de iniciação eucarióticos (eIFs) e os RNA transportadores (tRNA) contendo aminoácidos

específicos que formarão a proteína. Enquanto vai sendo produzida, a proteína recém sintetizada é dobrada, atingindo sua configuração exata e liberada na célula. Todo o processo de tradução e transcrição funciona coordenadamente à necessidade celular, mantendo dessa forma um ambiente homeostático intracelular e no organismo como um todo (Klann & Dever, 2004; Dever *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2010).

A expressão gênica pode ser regulada em diferentes níveis, sendo essa uma das formas dos organismos modularem suas respostas fisiológicas a diferentes estímulos externos e/ou internos (Tang & Schuman, 2002; Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Esse controle pode ocorrer em qualquer uma das etapas da via que vai do DNA para o RNA, até a proteína; como: (1) *controle transcricional*, determinando quando e como o gene é transcrito; (2) *controle do processamento de RNA*; (3) *transporte de RNA e controle localizacional* do núcleo para as regiões do citoplasma; (4) *controle traducional*, selecionando quais mRNAs serão traduzidos nos ribossomos; (5) *controle da degradação do mRNA* no citoplasma; ou (6) *controle da atividade protéica* pela ativação, desativação, degradação ou compartimentalização de proteínas após a síntese (Figura 4).

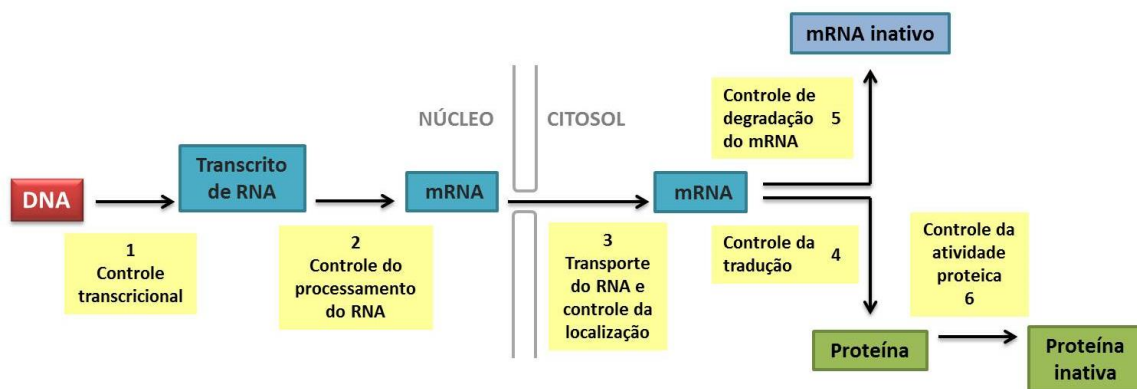


Figura 4: Passos pelos quais a expressão gênica eucariótica pode ser regulada. Adaptado de Alberts (2004).

Para a maioria dos genes, o controle transcricional é extremamente importante e eficiente, sendo mais econômico para a célula, pois evita o gasto de energia nas etapas seguintes da via de produção de proteínas. Por outro lado, o controle traducional permite alterações mais rápidas na concentração de proteínas, sendo então um mecanismo de manutenção da homeostasia juntamente com controles mais lentos e permanentes (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Assim, o controle traducional é considerado crucial em eventos como, estresse, restrição alimentar, crescimento (Sengupta *et al*; 2010), desenvolvimento e diferenciação celular, envelhecimento (Sonenberg & Hinnebusch, 2009), aprendizado e memória (Costa-Mattioli *et al*; 2009).

Considerando a importância da síntese de proteínas para que ocorra a formação de novas memórias, pesquisadores tem concentrado esforços para entender quais moléculas participam das vias de sinalização intracelular que regulam o mecanismo do aprendizado. Um destes alvos de estudo é a via da proteína TOR.

1.3 Proteína TOR

Por volta do ano de 1965, cientistas brasileiros estiveram na Ilha de Páscoa (também chamada de Rapa Nui na língua nativa), no Chile, buscando estudar microorganismos presentes no solo desta região; e encontraram a bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, que produzia metabólitos com propriedades antifúngicas. Cinco anos mais tarde, em 1970, um composto produzido por estas bactérias foi isolado e recebeu o nome de rapamicina, fazendo alusão ao nome nativo da ilha onde as amostras foram coletadas. Os estudos posteriores demonstraram que a rapamicina inibe a proliferação de células de mamíferos, além de possuir propriedades imunossupressoras. A partir de então, a rapamicina foi largamente estudada, no intuito de descobrir os mecanismos de ação desta molécula (Harris & Lawrence, 2003; Wullschleger, *et al.* 2006).

A proteína TOR foi identificada primeiramente em formas mutadas que apresentaram resistência às propriedades inibidoras da rapamicina, diminuindo o brotamento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Heitman *et al.*, 1991). Esta proteína é uma serina/treonina cinase altamente conservada entre os eucariotos e pode ser encontrada em dois complexos multiprotéicos. O primeiro deles, chamado de TORC1 de mamíferos (mTORC1) é sensível à rapamicina e é composto pelas proteínas: mTOR, raptor e mLST8. Este complexo é melhor caracterizado pela literatura e é responsável, principalmente, pelas funções de crescimento celular, respostas ao estresse e ao status energético, controle da síntese protéica, autofagia e apoptose. O segundo complexo, mTORC2, não é sensível à rapamicina e contém as proteínas: mTOR, rictor, mS1N1, PRR5 e mLST8. Este complexo está envolvido principalmente na formação do citoesqueleto celular (Hall, 2008; Laplante & Sabatini, 2012; Yang *et al.*, 2013). De maneira geral, ambos os complexos são estruturas chave na regulação metabólica, controlando principalmente o desenvolvimento e o crescimento celular (Hall, 2008; Yang *et al.*, 2013).

O papel da TOR é muito abrangente, incluindo ações catabólicas e anabólicas do metabolismo celular. Dentre eles estão a transcrição de genes, síntese de proteínas, formação de unidades ribossomais, transporte de nutrientes e metabolismo mitocondrial. Além disso, participa da regulação da degradação de moléculas de mRNA e de proteínas, da autofagia e da apoptose (Harris *et al.*, 2003; Hall, 2008; Laplante & Sabatini, 2012).

No cérebro, as funções da TOR variam entre regular a síntese de novas proteínas, monitorar o estado nutricional regulando a alimentação e participar de processos de plasticidade e consolidação de memórias de longa duração (Garelick & Kennedy, 2011). No que diz respeito à memória, a funcionalidade da TOR é influenciada pela atividade de plasticidade sináptica, onde receptores de membrana são

ativados e desencadeiam vias de sinalização intracelular. O aumento no influxo de cálcio, por exemplo, pode resultar na abertura de canais de cálcio voltagem dependente ou receptores NMDA. A partir daí, vias como MEK/ERK ou da proteína PI3K podem modular a atividade da TOR (Hoeffler & Klann, 2009; Garelick & Kennedy, 2011). Outros estudos demonstram que BDNF também promove aumento na atividade da TOR e conseqüentemente aumento na atividade traducional (Schratt *et al.*, 2004; Slipczuk *et al.*, 2009; Leal *et al.*, 2014).

Inúmeros estudos já demonstraram a necessidade de atividade da TOR durante o processo de consolidação da memória, principalmente utilizando o bloqueio da TOR através da rapamicina (Tang *et al.*, 2002; Myskiw *et al.*, 2008; Slipczuk *et al.*, 2009; Swiech *et al.*, 2008; Halloran *et al.*, 2012). Além disso, pesquisas demonstram que a presença da TOR nas regiões sinápticas regula a síntese de proteínas em locais específicos (Tang *et al.*, 2002; Garelick & Kennedy, 2011). Tang e colaboradores (2002), através de experimentos de imunocoloração, investigaram a presença da maquinaria de tradução em dendritos de neurônios hipocámpais, reforçando a ideia de que pode haver síntese de proteínas nos dendritos ou indicando que a síntese iniciou no soma e foi transportada para os dendritos.

Os alvos mais conhecidos dessa proteína são elementos pertencentes a maquinaria de controle traducional, que são regulados direta ou indiretamente por fosforilação, incluindo as proteínas eIF4G, eIF4B e 4E-BP1. A proteína 4E-BP1, por sua vez, controla o fator de iniciação eIF4E que está acoplado ao *cap* da extremidade 5' do mRNA. Quando esta proteína está acoplada ao *cap* não há interação do eIF4E com outros fatores de iniciação. Através da atividade da TOR, a proteína 4E-BP1 é fosforilada liberando o sítio de ligação do fator de iniciação eIF4E que poderá recrutar, então, outros fatores (como eIF4G e eIF4A), que irão favorecer a interação das

subunidades ribossomais com o mRNA (Figura 5) (Hall, 2008; Ma & Blenis, 2009; Sonenberg & Hinnebusch, 2009; Laplante & Sabatini, 2012).

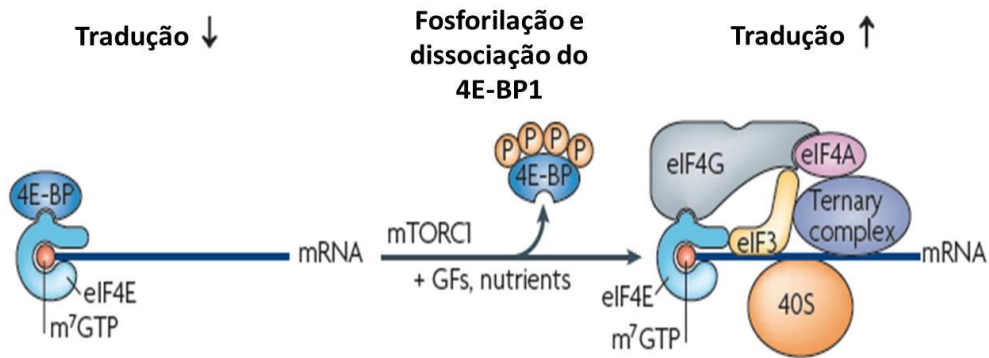


Figura 5: Ação da TOR sobre o fator de iniciação 4E-BP. Adaptado de Ma & Blenis (2009).

Outro importante alvo da TOR é a proteína p70S6K, que está envolvida tanto na síntese de novas proteínas, como na formação de novos ribossomos. Para seu funcionamento completo, a S6K precisa ser fosforilada em dois sítios específicos, um motivo hidrofóbico C-terminal e um sítio de domínio cinase. Uma vez ativada, esta proteína fosforila a subunidade ribossomal 40S, levando ao aumento da tradução de um subconjunto de mRNAs chamados 5'TOP, os quais codificam proteínas ribossomais e fatores de alongamento. Assim, a proteína S6K promove o aumento da capacidade total de tradução da célula (Figura 6) (Hall, 2008; Ma & Blenis, 2009; Laplante & Sabatini, 2012:~)

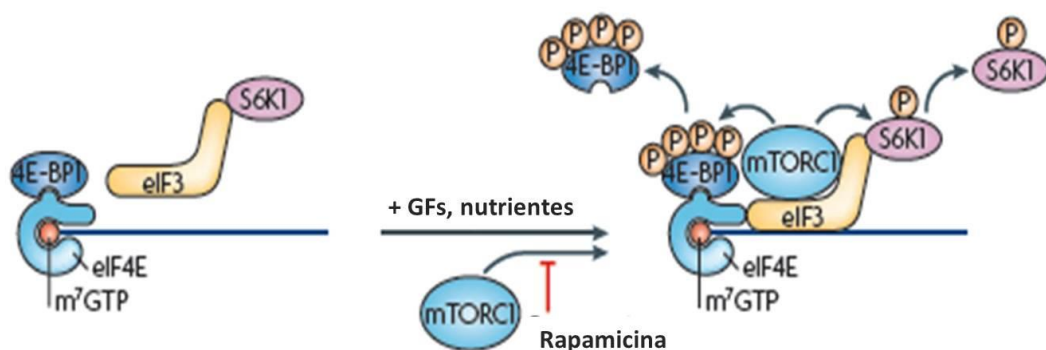


Figura 6: Ação da TOR sobre o fator de iniciação 4E-BP e sobre a proteína S6K, formando um complexo com a fita de mRNA. Adaptado de Ma & Blenis (2009).

Sendo a TOR tão abrangente em suas funções na célula, os pesquisadores também direcionaram o olhar ao papel desta proteína durante o envelhecimento. Sabe-se hoje que um cérebro saudável envelhece com perdas de funções neuronais muito sutis, sendo estas células mais sensíveis ao estresse oxidativo e ao acúmulo de proteínas, fosfolípidos e ácidos nucleicos no interior da célula. Ao longo do tempo, os neurônios também demonstram atividade mais lenta na liberação de cálcio no citosol e na produção de proteínas, além de menor taxa de neurogênese (Mattson *et al.*, 2002; Mouravlev *et al.*, 2006; Garelick & Kennedy, 2011).

Pesquisas demonstram que o bloqueio da TOR pode diminuir as taxas de envelhecimento celular (Harrison *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2011; Maiese *et al.*, 2013), e esta descoberta trouxe uma grande esperança nos estudos a respeito de doenças neurodegenerativas. Visto que algumas doenças estão associadas ao acúmulo de proteínas mal formadas no interior da célula, o bloqueio da TOR se mostra benéfico, retardando a tradução de novas proteínas. Além disso, o uso da rapamicina pode induzir a autofagia, promovendo uma reciclagem no interior da célula de proteínas e organelas mal formadas (Ravikumar *et al.*, 2004; Sarkar *et al.*, 2009; Stanfel *et al.*, 2009; Maiese *et al.*, 2013). Ao mesmo tempo que alguns estudos demonstram o prejuízo das funções cognitivas em animais tratados com rapamicina, outras pesquisas mostram o contrário, onde o uso da rapamicina melhora as funções de memória e retardam processos de neurodegeneração (Garelick & Kennedy, 2011). Sendo assim, é importante desvendar em quais níveis e em quais situações o uso da rapamicina pode ser benéfico.

1.4 Zebrafish como modelo biológico

O conhecimento a respeito da fisiologia de vertebrados avança consideravelmente graças ao uso de modelos biológicos como o peixe teleosteo *Danio rerio*, também chamado de *zebrafish* ou paulistinha. Desde os primeiros ensaios com

zebrafish, por volta da década de 1970, até hoje, este animal tornou-se um modelo de estudo importante graças as facilidades que oferece: baixo custo de manutenção, alta fecundidade, rápido desenvolvimento, transparência de ovo e larva (Gerlai, 2011; Kalueff *et al.*, 2014; Stewart *et al.*, 2014). Além disso, um passo determinante para o uso deste modelo foi o sequenciamento de seu genoma, o que proporcionou que uma ampla gama de ferramentas genéticas pudessem ser aplicadas a este animal (Kalueff *et al.*, 2014).

Hoje, sabe-se que a sequência de nucleotídeos dos genes de *zebrafish* apresenta cerca de 70% de similaridade com a de genes humanos. Além disso, 84% de genes associados a doenças tem genes homólogos em *zebrafish* (Kalueff *et al.*, 2014). Assim, o *zebrafish* se tornou um ótimo modelo de estudo sobre desenvolvimento, sistemas fisiológicos, redes neurais e mecanismos de doenças (Grunwald & Eisen, 2002; Gerlai *et al.*, 2010).

Embora filogeneticamente o *zebrafish* esteja distante dos humanos, muitos mecanismos fisiológicos permanecem altamente conservados, mostrando assim forte homologia a mamíferos (Cañestro *et al.* 2007). No campo das neurociências, estudos indicam que genes comprometidos com o desenvolvimento do sistema nervoso são conservado em peixes teleósteos, possibilitando assim comparações entre mamíferos e *zebrafish* (Cañestro, 2007; Mueller & Wullimann, 2009). Sabe-se também, que a organização geral do sistema nervoso entre estes animais é muito semelhante, seguindo a estrutura básica de outros vertebrados: prosencéfalo, mesencéfalo e romboencéfalo (Rinwitz *et al.*, 2011). Sub-regiões como bulbo olfatório, cerebelo e medula espinal, por exemplo, apresentam-se altamente conservadas entre as espécies (Friedrich *et al.*, 2010) e as áreas do cérebro menos semelhantes são telencéfalo e tectun. Porém zonas homólogas à amígdala, habênula e hipocampo também são encontradas em *zebrafish* (Mueller & Wullimann, 2009; Friedrich *et al.*, 2010; Kalueff *et al.*, 2014).

Assim como a anatomia cerebral, os sistemas de neurotransmissão também são altamente conservadas em *zebrafish* (Kalueff *et al.*, 2014), mostrando forte semelhança entre os sistemas gabaérgico, monoaminérgico e colinérgico (Panula *et al.*, 2006; Rinwitz *et al.*, 2011). Estudos envolvendo imageamento, genética e tarefas comportamentais revelam funcionamentos fisiológicos extremamente parecidos entre *zebrafish* e mamíferos (Stewart & Kalueff, 2012; Kalueff *et al.*, 2014).

Zebrafish apresenta um repertório comportamental vasto e muito semelhante a outros modelos já bem estabelecidos (Gerlai 2011; Stewart & Kalueff, 2012), assim, pode-se contar com esta espécie para estudar comportamentos complexos como, por exemplo, aprendizado e memória (Blaser & Vira, 2014), medo e ansiedade (Egan *et al.*, 2009; Blaser *et al.*, 2009), agressividade (Gerlai, 2003; Larson *et al.*, 2006; Moretz *et al.*, 2007), comportamento social (Engeszer *et al.*, 2007; Saverino & Gerlai, 2008) e sono (Zhdanova, 2006).

O envelhecimento é um dos processos fisiológicos já largamente estudados em diversos modelos animais, porém, o *zebrafish* foi visto como possível novo modelo a partir da última década (Kalueff *et al.*, 2014). Na figura 7 podemos observar um resumo das fases do desenvolvimento do *zebrafish*. Os embriões permanecem nos ovos cerca de 72 horas pós fertilização (hpf) e então eclodem entre 72 e 120 hpf. Inicia-se então o período larval que se estende até 30 dias pós fertilização (dpf). A fase juvenil vai de 30 dpf até 90 dpf e, a partir daí, temos o *zebrafish* adulto. Após 2 anos de vida, pode-se considerar o peixe como senescente e sua expectativa de vida varia entre 4 e 5 anos (Spence *et al.*, 2008; Kalueff *et al.*, 2014).

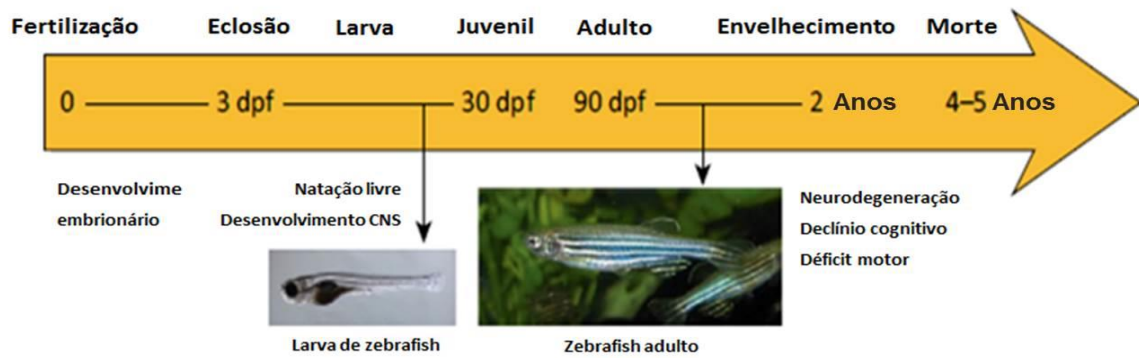


Figura 7: Estágios do desenvolvimento de *zebrafish* (*Danio rerio*)

Adaptado de Stewart *et al.* (2014).

Tendo as fases do desenvolvimento de *zebrafish* já descritas, pesquisas revelaram que este peixe apresenta senescência gradual, assim como em mamíferos (Keller & Murtha, 2004). Yu e colaboradores (2006) investigaram respostas cognitivas em peixes adultos de 1, 2 e 3 anos e obtiveram resultados que demonstram declínio cognitivo destes animais em função da idade. Os animais mais velhos apresentaram menor atividade locomotora e demoraram mais tempo para aprender uma resposta condicionada a um estímulo aversivo. Porém, todos os animais demoraram o mesmo tempo para aprender uma tarefa condicionada a um estímulo aversivo, o que sugere que animais mais velhos podem aprender rapidamente, porém exigem maior estimulação até adquirir a resposta condicionada. Sendo assim, o *zebrafish* se mostra um eficiente modelo para estudar deficiências cognitivas relacionada a idade ou distúrbios que levam a doenças de ordem neurológica.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar o padrão de expressão de genes que indicam para síntese de novas proteínas durante a consolidação da memória em cérebros de *zebrafish* (*Danio rerio*) jovens, adultos e velhos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade locomotora e o comportamento ansioso em *zebrafish* jovens, adultos e velhos;
- Avaliar a capacidade de aprendizado condicionado aversivo em *zebrafish* de diferentes idades;
- Avaliar a expressão dos genes de BDNF, da proteína TORC1, da proteína p70S6-quinase e do fator de iniciação eucariótico 4E-BP em *zebrafish* jovens, adultos e velhos durante o período de consolidação da memória.

MANUSCRITO

Gene expression of the TOR pathway involved in memory consolidation in zebrafish (*Danio rerio*) of different ages

Manuscrito a ser submetidos à revista Neurobiology of Learning and Memory

GENE EXPRESSION OF THE TOR PATHWAY INVOLVED IN MEMORY
CONSOLIDATION IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*) OF DIFFERENT AGES

Carolina da Silva Peixoto^a, Gustavo Morrone Parfitt^a, Gisele Eva Bruch Weber^a
Daniela Volcan Almeida^b, Luis Fernando Fernandes Marins^b, Daniela Martí
Barros^a

^aPrograma de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada,
Laboratório de Neurociências, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal
do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, 96210-900, Brazil

^b Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal
Comparada, Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, 96203-900, Brazil

Corresponding author

E-mail address: barrosdm@yahoo.com.br (D. M. Barros)

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico (CNPq). Daniela Martí Barros and Luis Fernando Marins are research
fellows from CNPq 304389/2012-9 and Carolina da Silva Peixoto received a graduate
fellowship from CAPES.

Abstract

TOR is a protein kinase involved in modulation of mRNA translation thereby regulating the protein synthesis. In neurons, this role is particularly important in the memory consolidation of long-term memory (LTM). One of the modulators of the TOR is brain derived neurotropic factor (BDNF), which promotes by TOR signaling the protein synthesis, synapses strengthening and creating new neural networks. We investigate the gene expression pattern of this pathway during memory consolidation in zebrafish of different ages. Our findings demonstrate that in old animals TOR activation occurs in the early phase of consolidation, following the same pattern of BDNF expression. Already, in young and middle-age animals this increase did not occur, as the BDNF expression also not so pronounced. Furthermore, the expression of the main protein regulated by TOR protein synthesis (4E-BP and p70S6K) remains the same pattern of TOR protein for all groups.

Key-words: zebrafish, memory consolidation, TOR protein, aging

1. INTRODUCTION

The neuronal plasticity process requires neural modulation triggered from new experiences, which leads to the process consolidation and storage of information in the central nervous system (CNS) (Izquierdo *et al.*, 2006). Memory consolidation depends on intracellular signalling cascades to promote new protein synthesis, stimulating synaptic reinforcement and the formation of new connections (Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 2006). The control of mRNA reading is one of the ways to regulate this protein synthesis and, it is crucial during stress, food restriction, growing (Sengupta *et al.*; 2010), development, cellular differentiation (Sonenberg *et al.*; 2009) and, learning and memory (Costa-Mattioli *et al.*; 2009). However, some efforts still need to be performed to the completely understanding of the intracellular mechanisms triggered by learning to promote new protein synthesis.

The serine/threonine kinase TOR is a highly conserved protein in eukaryotes and, it has been extensively studied as result of its function as metabolic regulator, controlling mainly development and cellular growing (Hall, 2008; Laplante & Sabatini, 2012). Concerning its function in the CNS, it is a well-known player in plasticity and protein synthesis regulator (Tang *et al.*, 2002; Garelick & Kennedy, 2011). The main TOR targets are the indirect target initiation factor eIF4E and the protein p70S6K. The factor eIF4E has its function indirectly modulated by TOR, through the TOR mediated phosphorylation of 4E-BP1 which releases its binding site favouring the mRNA interaction with ribosomal subunits. Differently, the protein p70S6K, after its direct activation by TOR, phosphorylates the ribosomal 40S subunit, leading to the translation of several 5'TOP mRNAs, which end with synthesis of several ribosomal proteins and elongation factors (Hall, 2008; Ma & Blenis, 2009; Sonenberg & Hinnebusch, 2009; Laplante & Sabatini, 2012).

TOR activity can be regulated by different intra and extracellular signals. In the CNS, the neurotropic factor BDNF has been pointed as one of the key drivers of TOR activation (Takei *et al.*, 2004; Slipczuk *et al.*, 2009), also BDNF signalling has been described as crucial for memory formation in many different learning paradigms (Hall *et al.*, 2000; Mizuno *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004; Bekinschtein *et al.*, 2007; Myskiw *et al.*, 2008).

The aim of this study was to evaluate the gene expression pattern of molecules involved with the protein synthesis and plasticity during memory consolidation in zebrafish of different ages. In this study, we have investigated the expression pattern of TOR pathway and BDNF genes during the consolidation of a fear memory in zebrafish of different ages. To evaluate this, we first validated the learning protocol for the different ages, in a novel inhibitory avoidance apparatus, to ensure that they passed through a consolidation period after the training. Since all groups were able to learn, we performed the mRNA expression during the memory consolidation. First, we analysed the TOR and their related effectors 4E-BP1 e p70S6K in different time points after training in young, middle-age and old animals. Also, we analysed the immediately early gene BDNF, one of the triggers of the TOR signalling pathway, in different periods of the consolidation for the different ages.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals and maintenance

Zebrafish (*Danio rerio*) were obtained from a commercial store (Red Fish, Porto Alegre, Brazil) and maintained for breeding and cultivation at the Institute of Biological Sciences – ICB – FURG. The animals were maintained in a recirculation water system equipped with a biological filter and UV light sterilization. The tanks had 15 liters of

capacity with a maximum density of 10 fish, pH around 7.0, controlled temperature (28 ± 2 °C) and a 14-10 h day/night photoperiod. All animals were fed twice daily *ad libitum* with balanced commercial diet (Tetra ColorBits). The experiments were performed with animals of three different ages: young (up to 3 months), middle-aged (7-9 months) and old (24 months). All protocols were reviewed and approved by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Rio Grande (FURG) under the process number 23116.008369/2013-91.

2.2 Behavioral tasks

2.2.1 Open field

The open field task was performed using a tank (12.3 cm height×38.7 cm width×47.3 cm length) divided in 12 equal sized zones, with a 3 cm of water column. Each fish was placed in the center of the tank and video recorded for 3 min, 30 seconds of habituation was given prior the beginning of the recording. To analyze the locomotor activity, the number of entries to each zone was documented. To analyze the anxiety like behavior, the time spend in the zones near to the walls of the tank relative to the total time in the tank was calculated based on recorded data. Measures of open field task were performed prior to the inhibitory avoidance task to ensure that the response in this test was not affected by the stress generated by that task (Kalueff *et al.*, 2014).

2.2.2. Inhibitory avoidance task

To evaluate animal ability to learn, inhibitory avoidance test was used, since the following tests will focus on the consolidation phase of memory. The apparatus was developed at the Institute of Biological Sciences, under a patent protocol in INPI (National Industrial Property Institute) under number 0000220704494890 in 09/07/2007 (Castro *et al.*, 2009). The apparatus consisted of a PVC pipe (33.0 X 7.3 X 8.0 cm) with

internal diameter of 7.3 cm divided into a dark zone and a bright zone. In the dark zone, two metallic plates were fixed vertically where the mild electrical shock was generated (5mA; 6V; unconditioned stimulus).

For training sessions, animals were placed in the bright side of the apparatus while the partition between the dark zone and bright zone was closed. After 3 min of habituation in the new environment, the partition was open, allowing the animal to cross to the dark zone. As soon as the animal crossed to the dark side entirely, the partition was closed and two sequential shocks were administered. Immediately after the shocks, the fish was removed from the apparatus and returned to the housing tank. The test sessions occurred 48 h after the training by repeating the training protocol, with the exception that no shock was administered. The long-term memory (LTM) was determined by the latency time to entry in the dark zone, if the fish do not enter the dark zone no shock is given, with a ceiling of 180 s. For the control group, the same protocol was used, but no animal received electrical shock.

2.3 Gene expression

The animals utilized for the gene expression experiments were divided in three experimental groups: 1) animals trained in the inhibitory avoidance task and killed at different times after training (30 min, 3 h and 6 h; referred as *Learning Group*); 2) animals that were exposed to the apparatus and did not receive shock in the inhibitory avoidance task, afterwards the animals were killed at different times after training (30 min, 3 h, 6 h; *Novelty Group*); and 3) animals removed from their home cages and killed immediately (*Naive Group*).

Each sample was performed using a pool of two whole zebrafish brains. The tissue was dissected out and rapidly frozen (-80 °C) in Trizol reagent (Invitrogen, Brazil) for subsequent total RNA extraction according to the manufacturer's protocol. To

confirm the integrity of RNA samples a gel electrophoresis in 1% agarose was performed. After extraction, for cDNA synthesis, samples of total RNA were reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Brazil). The total amount of RNA and cDNA was determined using a Qubit Fluorometer and Quant-iT Assay Kit (Invitrogen, Brazil). Then, gene amplification was performed using specific primers designed based on sequences available at GeneBank (Table 1) for real-time quantitative PCR (qPCR) with an ABI 7500 System (Applied Biosystems, Brazil) using Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Brazil). The conditions for qPCR reactions used were 50 °C for 2 min, 95 °C for 2 min, 40 cycles of 95 °C for 25 s and 60 °C for 30 s. Duplicates were ran for each sample and the expression level of the target genes was normalized by the expression of β -actin and Rp113. The geNorm VBA applet for Microsoft Excel was used to calculate a normalization factor and then was calculated the mean normalized expression of the target genes (Vandesompele *et al.* 2002).

2.4 Statistical analysis

Gene expression analyses were performed using triplicates in each experiment. Data are expressed as mean \pm standart error and analyzed with ANOVA followed by Fisher's posttest. Results of behavior test were analyzed by One-Way ANOVA test of variance followed by Fisher's *post hoc* test. Data is presented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Differences were considered significant when $p < 0,05$.

3. RESULTS

3.1 Locomotor activity and anxiety like behavior

Open field test was performed to investigate possible differences in locomotor activity and anxiety behavior among the groups studied. In locomotor activity, higher number of crossings was observed in old fish group when compared to young and middle-age groups (Fig. 1A). In anxiety like behavior the old group showed significant decrease between the middle-age group in the time spend in the periphery of the apparatus (Fig. 1B).

3.2 Long-term fear memory acquisition in different zebrafish ages for the novel inhibitory avoidance task apparatus.

To investigate possible effects of learning on gene expression, we first performed the inhibitory avoidance test in animals of three different ages to confirm that the subjects were able to learn the task. The young animals submitted to the avoidance task and referred as learning group, showed an increase latency time for the LTM test, also this group displayed an increased latency when compared to the novelty group (Fig. 2A). Concerning the young fish novelty group no difference was observed in the latency time after the exposure to the apparatus (Fig. 2A). The same pattern of learning was observed in the middle-age group, an increase in the latency after training and a significant difference compared to respective novelty group (Fig. 2B). As predicted no alterations in the latency for the middle-age novelty group were observed after the exposure to the apparatus (Fig. 2B). In the old group also was observed difference in learning group. It was observed an increase in the latency time when compared to the training and the novelty group (Fig. 2C). In the novelty group, no change was observed in latency time after exposure to the apparatus (Fig. 2C).

3.3 Relative BDNF mRNA expression in zebrafish brain of different ages

Since the inhibitory avoidance test in this novel apparatus promotes conditioning learning in the animals of different ages, we were able to investigate possible modulations in the BDNF gene expression during the process of memory consolidation. Figure 3 shows the relative expression of BDNF mRNA in the different experimental groups. In young animals, no change was observed between novelty group and naive group. In the animals of learning group, significant increase in BDNF mRNA expression was observed 30 min after training (Fig. 3A). Furthermore, there was a significant increase in BDNF mRNA expression 6 h after training, but in a lesser magnitude (Fig. 3A). This expression pattern did not repeat in middle-age and old animals. In middle-age animals, compared to naive group, a significant increase was observed 30 min after training in no shocked novelty animals (Fig. 3B) and significant increase in all times after training in learning group (Fig 3B). In old animals, there was significant increased expression in all experimental groups compared to naive (Fig 3C). However, among animals of learning group, we noticed a decrease in BDNF expression 6 h after training compared to 3 h and 30 min (Fig. 3C).

3.4 Relative TOR mRNA expression in zebrafish brain of different ages

TOR protein can be activated by BDNF triggering an intracellular signaling that promotes the synthesis of new proteins (Garelick & Kennedy, 2011; Slipczuk *et al.*, 2009). Thus, we sought to evaluate the expression pattern of TOR during different time points of memory consolidation. In young animals, all groups showed no increase in the TOR expression when subjected to IA test when compared to the naive group, excluding animals that received shock and showed an increase in TOR expression 6 h after training (Fig. 4A). Concerning the middle-age animals, all groups also showed no alterations in the expression, with the exception of an increase 30 min after training in novelty group when compared to naive group (Fig. 4B). In the old animals, no

alterations in the TOR expression were observed comparing novelty group and naive group. However, significant increase in TOR expression was observed 30 min and 3 h after training in the learning group (Fig. 4C).

3.5 Relative mRNA expression of the two main effectors of TOR protein: eIF4E-BP and p70S6K

The two main effectors of TOR protein showed a similar expression pattern among the groups. In young learning groups, the same pattern was also found in two analyzed genes showing significant increase in mRNA expression 30 min and 6 h after training (Fig. 5A and 5D). This response is preserved in middle-age animals, but this pattern also was observed in novelty groups compared to naive group in both genes (Fig. 5B and 5E). In old animals, the response pattern is different. It was observed an increase in mRNA expression of learning group 30 min and a significant increase 3 h after training (Fig. 5C and 5F). Finally, 6 h after training no differences were observed relative to naive group (Fig. 5C and 5F). The p70S6K mRNA expression increased in old animals compared to the novelty group, which was not observed in eIF4E-BP mRNA expression (Fig. 5 C and F).

4. DISCUSSION

The main findings of this work showed that memory consolidation induced a general increase in genes related to new protein synthesis and plasticity in zebrafish. Surprising, the old animals had an expressive increase in genic expression, higher than in younger subjects, mainly in the early phases of consolidation. In general, animals of different ages showed different patterns of gene expression during memory

consolidation, indicating different molecular responses between ages. However, the gene expression of the pathway that involves protein synthesis by BDNF – TOR signaling worked synchronously in all animal groups, with modulation in the gene expression studied during the same moments of memory consolidation.

Initially, we performed a locomotor activity test using an open field to evaluate any possible locomotor difference which could have biased the interpretation of the IA results. We found no locomotor alterations in the young group, however the old animals showed an increase in the locomotor activity. This locomotor increase may be explained by their increased size (table 2) thus, the lower number of crossings observed in smaller size animals do not mean that their locomotor activity is reduced. This result suggests that, although zebrafish at this age have been characterised as old, they did not present decline in their locomotor capacity.

Since that the tested ages had the capacity of acquire and retrieve the long term fear memory in the IA, we went further to evaluate the mechanism involved in this learning. There is an suggestion that BDNF is involved in memory consolidation in zebrafish for all studied ages, since during the consolidation the BDNF gene was induced in the early stages of consolidation remaining up regulated in late stages. This up regulation was also observed in the novelty group for the middle-age and old animals. These results suggest that BDNF up regulation due to the learning is not specific of the IA learning, suggesting that both the aversive learning and novelty can trigger this signalling (Izquierdo *et al.*, 2003, Izquierdo *et al.*, 2001). Interestingly, was observed an increase in the expression of BDNF mRNA in old animals of the novelty group, differently from the young animals. This leads us to think that the novelty, in this study, was more impactful to the brain of older animals.

BDNF expression is described as essential for the memory consolidation in the first hours after learning for the formation and persistence of this new memory (Alonso

et al., 2014; Bekinschtein *et al.*, 2007; Soulé *et al.*, 2006). Recently, Alonso and colleagues (2014) have also demonstrated BDNF is required of in narrow time window after training in the parietal cortex for the IA task (Alonso *et al.*, 2014). Besides the IA task, it is well known that the exposition to novel environments can induce BDNF expression and promote plasticity, and this novelty induced BDNF expression is also found in old animals (Li *et al.*, 2013; Izquierdo *et al.*, 2003; Izquierdo *et al.*, 2001). In addition, the increase in BDNF mRNA expression in this work occur at the same time that the increased activity of PKA in IA task showed by Bernabeu *et al.* (1997).

As in the BDNF expression, TOR also followed a distinct expression patten related to the subject age, with a match in their spikes of expression with the BDNF increase. Differently from middle-age and young fish, the old animals displayed an earlier increase in the TOR mRNA during the consolidation. This result may be associated with a state of the normal aging brain neuronal where cellular functions are reduced (Garelick & Kennedy, 2011). In the young and middle-age groups, this increase in the TOR mRNA was not observed, which does not necessarily means that the TOR cascade is not engaged in the fear memory consolidation, they may have been activated without the necessity of mRNA production. We observed that in these groups the increase BDNF expression was not prominent as in the old animals. Thus, that increase in BDNF expression may have not been sufficient to activate the protein synthesis of TOR and its effectors. The increase in the TOR expression, in old animals, at 30 min and 3h after training agrees with Slipczuk *et al.* (2009) findings. Their findings show a two time window TOR activation (immediately and 3h) after training for the IA. Besides, this increase depends on BDNF signalling. Concerning the 4E-BP e p70S6K expression the same pattern was observed. Once these proteins are related to the TOR pathway, it was expected that their expression pattern follow the same increase found for TOR and BDNF.

Thus, we here reported gene expression during the learning events in zebrafish of different ages, showing that their physiological responses can respond differently. We also demonstrated that a synchronized regulation occurred, once gene results for BDNF, TOR, 4E-BP e p70S6K had the same patten for each age separately. Thus, we reinforce that the BDNF - TOR pathway can be an importance study field in the cellular homeostasis maintaining in heath and disease.

5. REFERENCES

- Alonso M., Bekinschtein P., Cammarota M., Vianna M.R.M., Izquierdo I., Medina J.H. (2014) Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learning Memory*. 12, 504-510.
- Bekinschtein P., Katche C., Slipczuk L.N., Igaz L.M., Cammarota M., Izquierdo I., Medina J.H. (2007) mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiology of learning and memory*. 87(2)303-307.
- Bernabeu R., Bevilaqua L., Ardenghi P., Bromberg E., Schmitz P., Bianchin M., Izquierdo I., Medina J.H. (1997) Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94, 7041-7046.
- Castro M.R., Lima J.V., Freitas D.P., Valente R.S., Dummer N.S., Aguiar R.B., Santos L.C., Marins L.F., Geracitano L.A., Monserrat J.M., Barros D.M. (2009) Behavioral and neurotoxic effects of arsenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei: Cyprinidae). *Comparative biochemistry and physiology*. 150(3)337-342.
- Garelick M.G., Kennedy B.K. (2011) TOR on the brain. *Experimental Gerontology*, 46, 155-163.
- Hall M.N. (2008) mTOR – What does it do? *Transplantation proceedings* 40, S5-S8.

- Hall J., Thomas K.L., Everitt B.J. (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nature neuroscience*. 3(6), 533-535.
- Izquierdo I., Bevilacqua L.R., Rossato J.I., Bonini J.S., Medina J.H., Cammarota M. (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences*. 29(9):496-505.
- Izquierdo L.A., Barros D.M., Medina J.H., Izquierdo I. (2000) Novelty enhances retrieval of one-trial avoidance learning in rats 1 or 31 days after training unless the hippocampus is inactivated by different receptor antagonists and enzyme inhibitors. *Behavioural Brain Research*. 117,215-220.
- Izquierdo L.A., Barros D.M., Medina J.H., Izquierdo I. (2003) Exposure to novelty enhances retrieval of very remote memory in rats. *Neurobiology of learning and memory*. 79, 51-56.
- Izquierdo L.A., Viola H., Barros D.M., Alonso M., Vianna M.R.M., Furman M., Levi de Stein M., Szapiro G., Rodrigues C., Choi H., Medina J.H., Izquierdo I. (2001) Novelty enhances retrieval: molecular mechanisms involved in rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 13, 1464-1467.
- Laplante M., Sabatini D.M. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149, 274-293.
- Li S., Jin M, Zhang D, Yang T, Koeglsperger T, Fu H, Selkoe DJ. (2013) Environmental novelty activates β 2 adrenergic signaling to prevent the impairment of hippocampal LTP by A β oligomers. *Neuron*. 77(5), 929-941.
- Liu I.Y., Lyons W.E., Mamounas L.A., Thompson R.F. (2004) Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*. 24(36), 7958-7963.
- Ma X.M., Blenis J. (2009) Molecular mechanisms of mTOR – mediated translational control. *Molecular cell biology*, 10, 307-318.

- Mizuno M., Yamada K., Olariu A., Nawa H., Nabeshima T. (2000) Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *The Journal of Neuroscience*. 20(18), 7116-7121.
- Myskiw J.C., Rossato J.I., Bevilaqua L.R.M., Medina J.H., Izquierdo I., Cammarota M. (2008) *Neurobiology of Learning and Memory*, 89, 338-351.
- Nithianantharajah J., Hannan A.L. (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature reviews*. 7, 697-709.
- Praag H., Kempermann G., Gage F.H. (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nature reviews*. 1(3)191-198.
- Sengupta S., Peterson T.R., Sabatini D.M. (2010) Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors and stress. *Molecular Cell*, 40, 310-322.
- Slipczuk L., Bekinschtein P., Katche C., Cammarota M., Izquierdo I., Medina J.H. (2009) BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *Plos One*, 4(6) e6007.
- Sonenberg N., Hinnebusch A.G. (2009) Regulation of translational initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136, 731-745.
- Soulé J., Messaoudi E., Bramham C.R. (2006) Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. *Biochemical Society Transactions*. 34, 600-604.
- Tang S.J., Schuman E.M. (2002) Protein synthesis in the dendrite. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 357, 521-529.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 18;3(7):RESEARCH0034

Figures and captions

Figure 1. Means of number of squares crossed in young, middle-age and old animals in the open field task (A) and relative time spend in the periphery of the apparatus by young, middle-age and old animals in the open field task. * $p < 0.05$. $n = 13-22$ per group.

Figure 2. Means of memory latency to enter to the dark compartment in young (A), middle-age (B) and old (C) animals trained on the inhibitory avoidance test (learning group) and animals arriving in the apparatus but received no shock (novelty group). Data are expressed as mean (\pm SEM). * $p < 0.05$. $n = 8-12$ per group.

Figure 3. Relative mRNA expression of BDNF in young (A), middle-age (B) and old (C) animals. The dotted red line represents the mean mRNA expression in naïve group, while the bars represent novelty group (left) and learning group (right) sacrificed 30 min, 3 h and 6 h after training. * Statistically significant difference between animals trained on the inhibitory avoidance task (novelty or learning) and naïve group ($p < 0,05$). # statistically significant difference between novelty group and learning group at the same experimental time ($p < 0,05$). @ Statistically significant difference between the three experimental times within the same group (novelty or learning) ($p < 0,05$). $n = 5$ per group.

Figure 4. Relative mRNA expression of TOR in young (A), middle-age (B) and old (C) animals. The dotted red line represents the mean mRNA expression in naïve group, while the bars represent novelty group (left) and learning group (right) sacrificed 30 min, 3 h and 6 h after training. * Statistically significant difference between animals trained on the inhibitory avoidance task (novelty or learning) and naïve group ($p < 0,05$). # statistically significant difference between novelty group and learning group at the same experimental time ($p < 0,05$). @ Statistically significant difference between the three experimental times within the same group (novelty or learning) ($p < 0,05$). $n = 5$ per group.

Figure 5. Relative mRNA expression of Eif4E-BP and p70S6K in young (A and D), middle-age (B and E) and old (C and F) animals. The dotted red line represents the mean mRNA expression in naïve group, while the bars represent novelty group (left) and learning group (right) sacrificed 30 min, 3 h and 6 h after training. * Statistically

significant difference between animals trained on the inhibitory avoidance task (novelty or learning) and naïve group ($p < 0,05$). # Statistically significant difference between novelty group and learning group at the same experimental time ($p < 0,05$). @ Statistically significant difference between the three experimental times within the same group (novelty or learning) ($p < 0,05$). $n = 5$ per group.

Table 1. Specific primers used for real-time PCR analyses and GenBank accession number.

Gene	Primer sequence	GenBank accession number
Target of rapamycin (TOR)	F: 5'-CACACGAGGTGCAGGTATGG-3' R: 5'-TGA CTGGAACATCACCAGACG-3'	XM_001919253
eIF4E-BP	F: 5'-CTTCAGGCGGCAGGAGATAC-3' R: 5'-CCACTCGCTCCTTTTGACGA-3'	NM_198373
p70S6KB	F: 5'-CCGTTACCTCGCCGGTTCT-3' R: 5'-CCGGGTAAGGTGGGACCTCGT-3'	XM_005157417
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	F: 5'-GCTCTCTCAATGCGCACTAC-3' R: 5'-TGA CTGAGCGGATCCTTTGG-3'	NM_131595
β-actin	F: 5'-CCACCCCACTTCTCTCTAAGGA-3' R: 5'-ACCTCCCCTGTGTGGACTTG-3'	NM_001101.3
Rp113	F: 5'-TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC-3' R: 5'-AGACGCACAATCTTGAGAGCAG-3'	NM_212784

Table 2: Means (\pm S.E.M) of weights and lengths of the animals used in the behavioral experiments. Analyzed by one way ANOVA followed by Fisher's post test. All means are significantly different among the groups for both measures.

	Young	Middle-age	Old
Weight (g)	0,116 \pm 0,020	0,292 \pm 0,013	0,844 \pm 0,034
Length (cm)	1,977 \pm 0,053	3,142 \pm 0,052	4,285 \pm 0,047

Figure 1

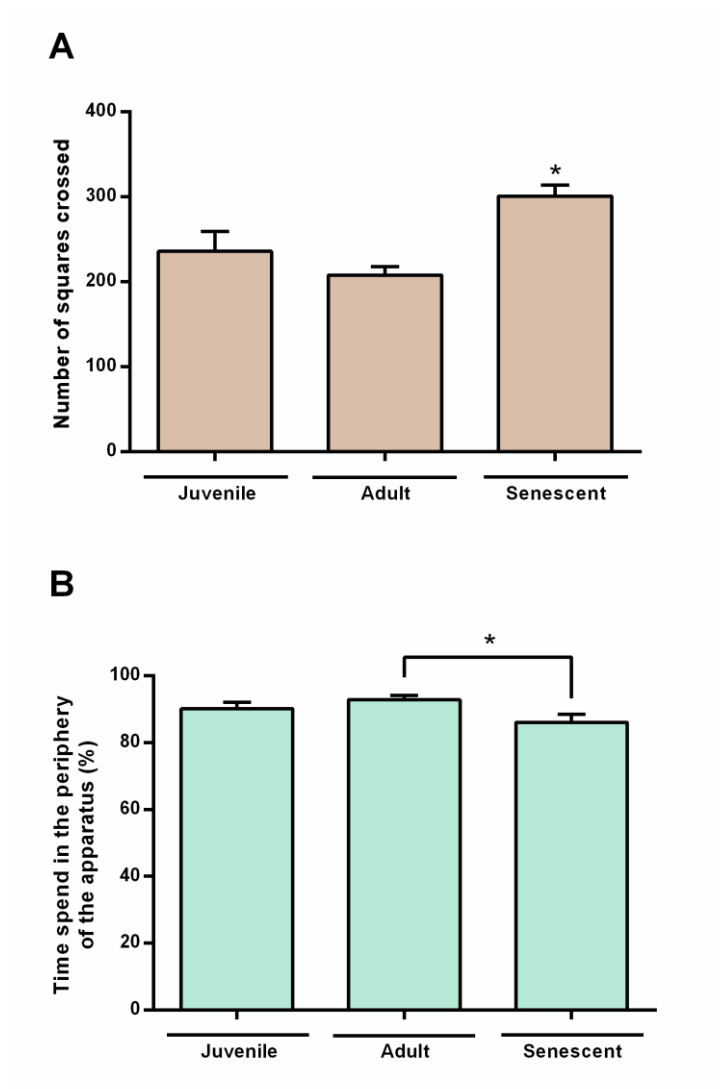


Figure 2

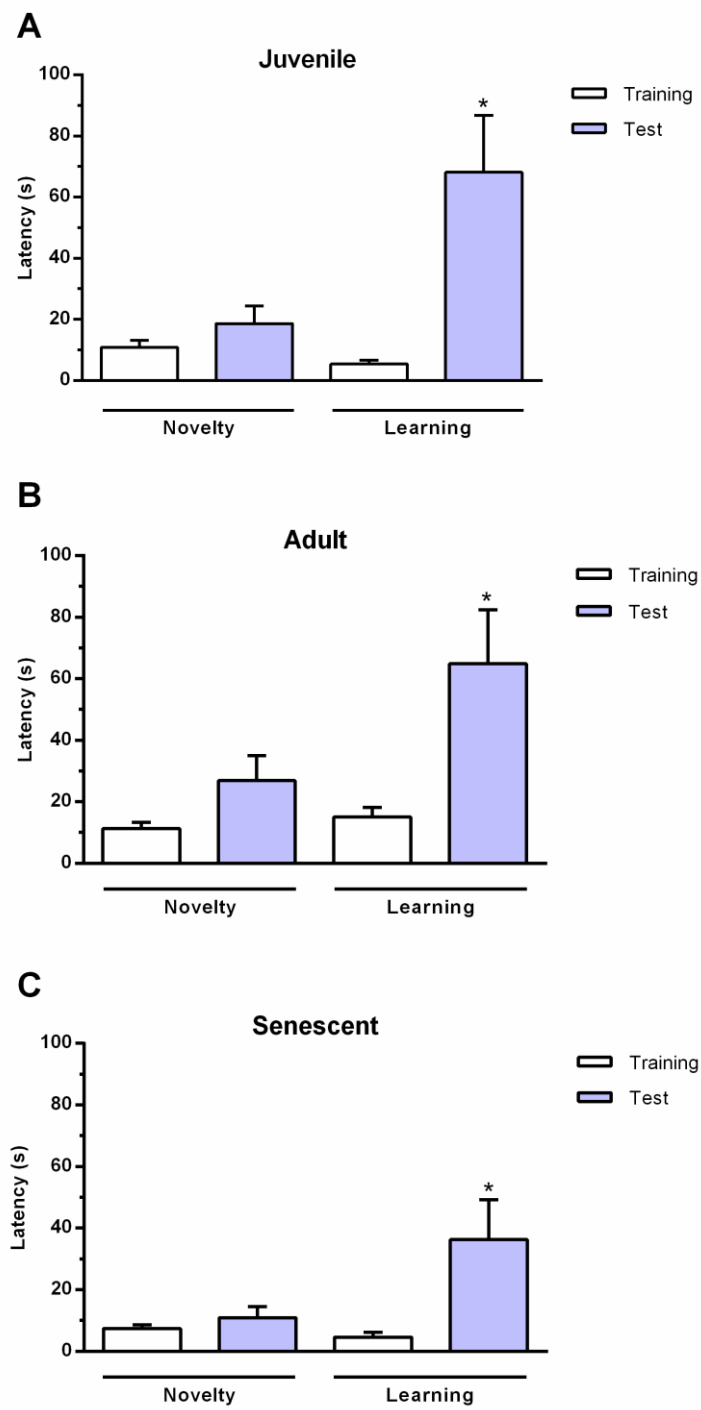


Figure 3

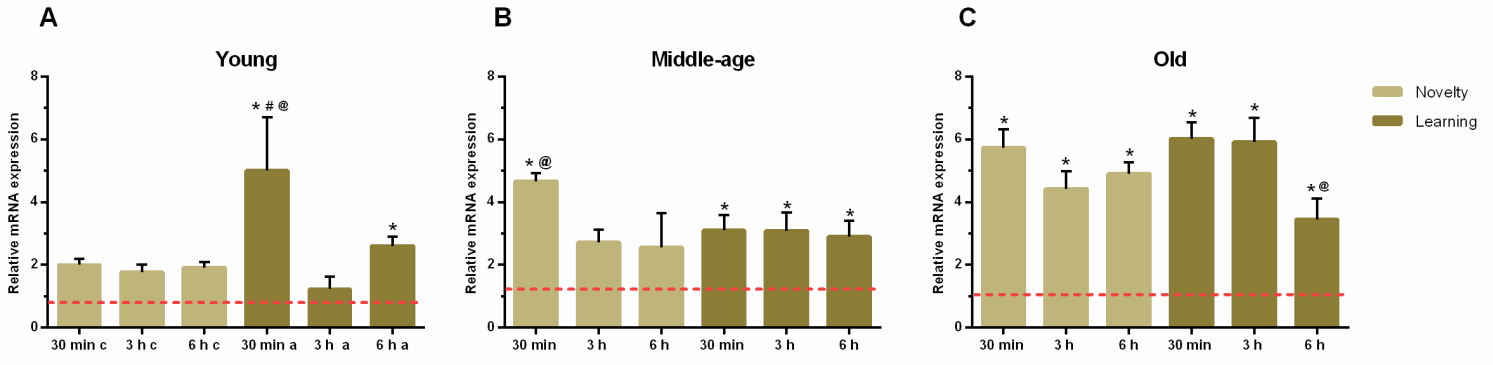


Figure 4

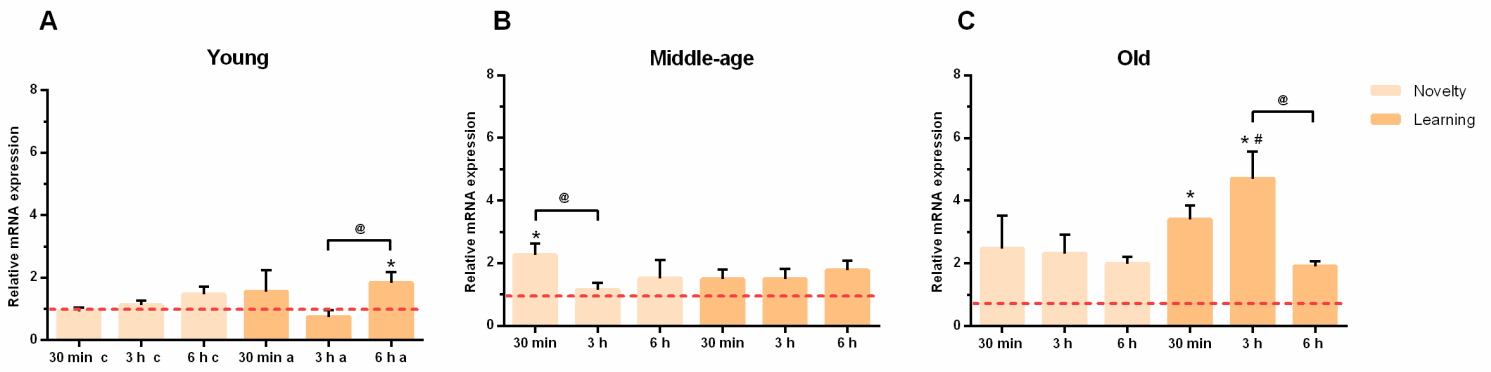
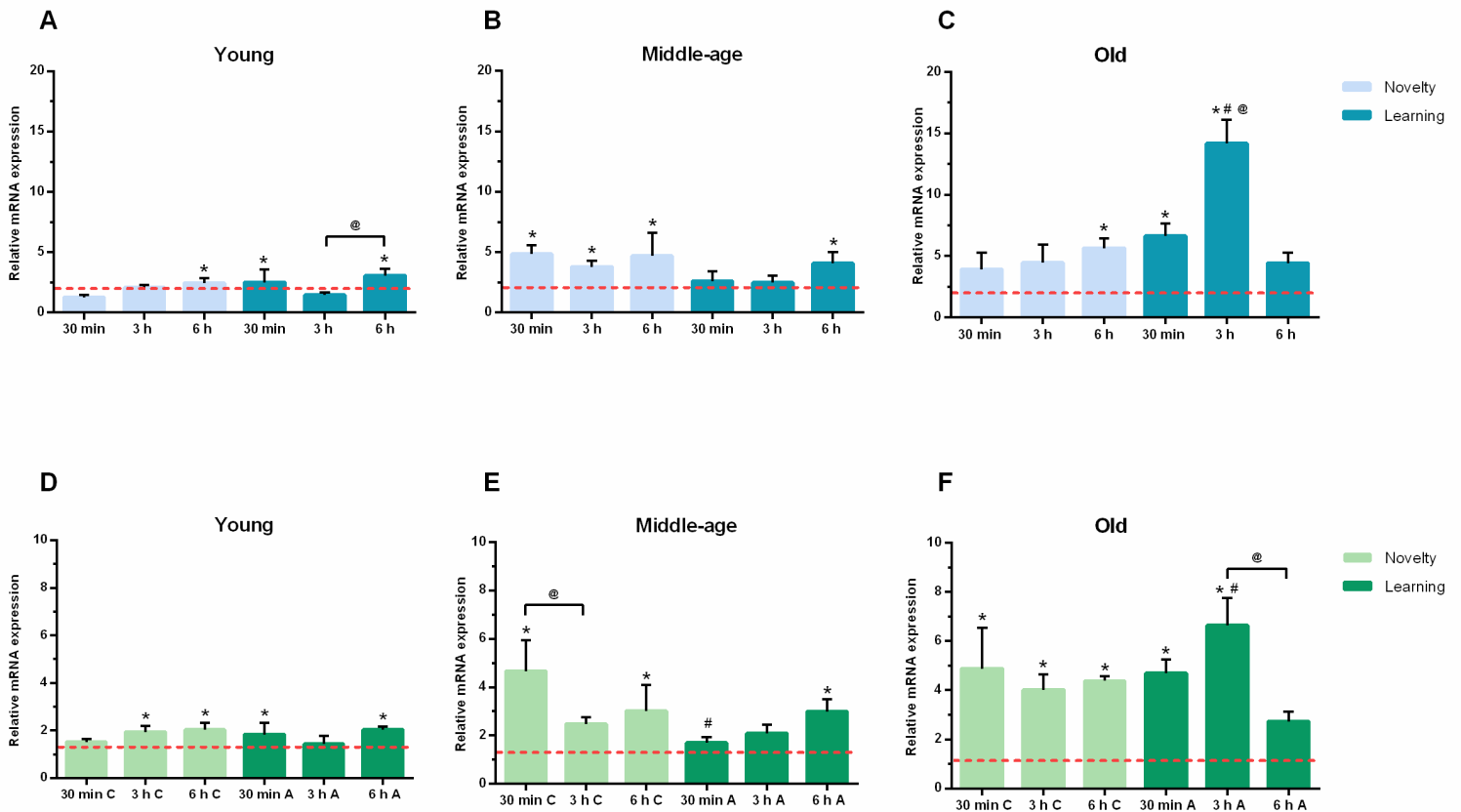


Figure 5



3. Considerações finais

Este estudo buscou investigar mecanismos intracelulares de síntese proteica envolvendo a via ativada por BDNF e proteína TOR em cérebros de *zebrafish* de diferentes idades. Tendo em vista que ainda há muito a ser compreendido a respeito das vias de sinalização intracelular que promovem a consolidação da memória, este estudo fornece informações relevantes sobre a expressão de genes envolvidos na via da TOR em um modelo com alta semelhança a mamíferos.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem padrões de expressão gênica distintos entre animais de diferentes idades e levantam questões importantes sobre o envelhecimento neural. Além disso, os resultados de expressão dos genes investigados mostram que a via BDNF-TOR funciona de forma sincronizada, como já previsto em outros estudos utilizando mamíferos. Além disso, este estudo contribui com conhecimentos a respeito do *zebrafish* como um modelo de estudo de envelhecimento e memória.

Como perspectiva, prevemos o uso do bloqueador da atividade da TOR para investigar efeitos nas funções de memória e aprendizado nestes animais. Além disso, a avaliação da quantidade de proteínas totais e fosforiladas poderia elucidar questões sobre as respostas celulares em função da modulação na atividade da via investigada.

4. Referências

- Alonso M., Bekinschtein P., Cammarota M., Vianna M.R.M., Izquierdo I., Medina J.H. (2014) Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learning Memory*. 12, 504-510.
- Bailey CH., Barco A., Hawkins R.D., Kandel E.R. (2008) Molecular studies of learning and memory in *Aplysia* and the hippocampus: A comparative analysis of implicit and explicit memory storage. *Learning and memory*. 4, 11-29.
- Bekinschtein P., Katze C., Slipczuk L.N., Igaz L.M., Cammarota M., Izquierdo I., Medina J.H. (2007) mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiology of learning and memory*. 87(2)303-307.
- Bernabeu R., Bevilacqua L., Ardenghi P., Bromberg E., Schmitz P., Bianchin M., Izquierdo I., Medina J.H. (1997) Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94, 7041-7046.
- Blaser R.E., Chadwick L., McGinnis G.C. (2009) Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 208, 56-62.
- Blaser R.E., Vira D.G. (2014) Experiments on learning in zebrafish (*Danio rerio*): a promising model of neurocognitive function. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 42, 224-231.
- Cañestro C., Yokoi H., Postlethwait J.H. (2007) Evolutionary developmental biology and genomics. *Nature reviews - Genetics*, 8, 932-942.
- Castro M.R., Lima J.V., Freitas D.P., Valente R.S., Dummer N.S., Aguiar R.B., Santos L.C., Marins L.F., Geracitano L.A., Monserrat J.M., Barros D.M. (2009) Behavioral and neurotoxic effects of arsenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei: Cyprinidae). *Comparative biochemistry and physiology*. 150(3)337-342.
- Costa-Mattioli M., Sossin W.S., Klann E., Sonenberg N. (2009) Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron*, 61, 10-26.

- Dever T. E., Dar A. C., Sicheri F. (2007) Translational control in biology and medicine (eds Mathews, M. B., Sonenberg, N. & Hershey, J. W. B.) 319–344 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- Ebert D.H., Greenberg M.E. (2013) Activity-dependent neuronal signaling and autism spectrum disorder. *Nature*. 493,327-337.
- Egan R.J., Bergner C.L., Hart P.C., Cachat J.M., Canavello P.R., Elegante M.F., Elkhayat S.I., Bartels B.K., Tien A.K., Tien D.H., Mohnot S., Beeson E., Glasgow E., Amri H., Zukowska Z., Kalueff A.V. (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research* 14; 205(1):38-44.
- Engeszer R.E., Barbiano L.A., Ryan M.J., Parichy D.M. (2007) Timing and plasticity of shoaling behaviour in the zebrafish, *Danio rerio*. *Animal Behaviour*, 74(5), 1269-1275.
- Engeszer R.E., Barbiano L.A., Ryan M.J., Parichy D.M. (2007) Timing and plasticity of shoaling behaviour in the zebrafish, *Danio rerio*. *Animal Behaviour*. 74, 1269-1275
- Evans D.S., Kapahi P., Hsueh W., Kockel L. (2011) TOR signaling never gets old: Aging, longevity and TORC1 activity. *Ageing Research Reviews*, 10, 225-237.
- Friedrich R.W., Jacobson G.A., Zhu P. (2010) Circuit neuroscience in zebrafish. *Current Biology*, 20(8) R371-R381.
- Garelick M.G., Kennedy B.K. (2011) TOR on the brain. *Experimental Gerontology*, 46, 155-163.
- Gerlai R. (2010) High-Throughput behavioral screens: the first step towards finding genes involved in vertebrate brain function using zebrafish. *Molecules*, 15, 2609-2622.
- Gerlai R. (2011) A small fish with a big future: zebrafish in behavioral neuroscience. *Reviews in the neuroscience*, 22(1), 3-4.
- Gerlai, R. (2003) Zebra Fish: an uncharted behavior genetic model. *Behavior Genetics*, 33(5), 461-468.

- Grunwald D.J., Eisen J.S. (2002) Headwaters of the zebrafish – emergence of a new model vertebrate. *Nature*, 3, 717-724.
- Hall M.N. (2008) mTOR – What does it do? *Transplantation proceedings* 40, S5-S8.
- Hall J., Thomas K.L., Everitt B.J. (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nature neuroscience*. 3(6), 533-535.
- Halloran J., Hussong S.A., Burbank R., Podlitskaya N., Fischer K.E., Sloane L.B., Austad S.N., Strong R., Richardson A., Hart M.J., Galvan V. (2012) Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin by rapamycin modulates cognitive and non-cognitive components of behavior throughout lifespan in mice. *Neuroscience*, 223, 102-113.
- Harris T.E. & Lawrence J.C. (2003) TOR signaling. *Science*, re15(212).
- Harrison D.E., Strong R., Sharp Z.D., Nelson J.F., Astle C.M., Flurkey K., Nadon N.L., Wilkinson J.E., Frenkel K., Carter C.S., Pahor M., Javors M.A., Fernandez E., Miller R.A. (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460(7253), 392-395.
- Heitman J., Movva N.R., Hall M.N. (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905-909.
- Hoeffler C.A., Klann E. (2009) mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trend in Neurosciences*, 33, 67-75.
- Izquierdo I., Bevilacqua L.R., Rossato J.I., Bonini J.S., Medina J.H., Cammarota M. (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences*. 29(9):496-505.
- Izquierdo I., Medina J.H. (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*. 68(3):285-316.
- Izquierdo L.A., Barros D.M., Medina J.H., Izquierdo I. (2000) Novelty enhances retrieval of one-trial avoidance learning in rats 1 or 31 days after training unless

the hippocampus is inactivated by different receptor antagonists and enzyme inhibitors. *Behavioural Brain Research*. 117,215-220.

Izquierdo L.A., Barros D.M., Medina J.H., Izquierdo I. (2003) Exposure to novelty enhances retrieval of very remote memory in rats. *Neurobiology of learning and memory*. 79, 51-56.

Izquierdo L.A., Viola H., Barros D.M., Alonso M., Vianna M.R.M., Furman M., Levi de Stein M., Szapiro G., Rodrigues C., Choi H., Medina J.H., Izquierdo I. (2001) Novelty enhances retrieval: molecular mechanisms involved in rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 13, 1464-1467.

Jackson R.J., Hellen C.U., Pestova T.V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11, 113-127.

Kalueff A.V., Stewart A.M., Gerlai R. (2014) Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(2), 63-75.

Kandel E.R. (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544):1030-8.

Keller E.T., Murtha J.M (2004) The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 138,335-341.

Klann E., Dever T.E. (2004) Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nature reviews. Neuroscience*. 5, 931-942.

Lamprecht R., LeDoux J. (2004) Structural plasticity and memory. *Nature Neuroscience*, 5, 45-54.

Laplante M., Sabatini D.M. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149, 274-293.

- Larson E.T., O'Malley D.M., Melloni R.H. (2006) Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 167, 94-102.
- Leal G., Comprido D., Duarte C.B. (2014) BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76, 639-656.
- Li S., Jin M, Zhang D, Yang T, Koeglsperger T, Fu H, Selkoe DJ. (2013) Environmental novelty activates β 2 adrenergic signaling to prevent the impairment of hippocampal LTP by A β oligomers. *Neuron*. 77(5), 929-941.
- Liu I.Y., Lyons W.E., Mamounas L.A., Thompson R.F. (2004) Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*. 24(36), 7958-7963.
- Lucon-Xiccat T., Dadda M. (2014) Assessing memory in zebrafish using the one-trial teste. *Behavioral Processes*, 106, 1-4.
- Ma X.M., Blenis J. (2009) Molecular mechanisms of mTOR – mediated translational control. *Molecular cell biology*, 10, 307-318.
- Maiese K., Chong Z.Z., Shang Y.C., Wang S. (2013) mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system. *Trends in Molecular Medicine*, 19(1) 51-60.
- Malenka R.C., Nicoll R.A. (1999) Long-term potentiation – a decade of progress? *Science*, 285(5435) 1870-1874.
- Mattson M.P., Chan S.L., Duan W. (2002) Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet and behavior. *Physiological Reviews*, 82(3) 637-672.
- Mizuno M., Yamada K., Olariu A., Nawa H., Nabeshima T. (2000) Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *The Journal of Neuroscience*. 20(18), 7116-7121.
- Moretz J.A., Martins E.P., Robison B.D. (2007) Behavioural syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. *Behavioral Ecology*, 18, 556–562.

- Mouravlev A., Dunning J., Young D., During M.J. (2006) Somatic gene transfer of cAMP response element-binding protein attenuates memory impairment in aging rats. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 103(12), 4705-4710.
- Mueller T., Wullmann M.F. (2009) An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy. *Brain, Behavior and Evolution*, 74, 30-42.
- Myskiw J.C., Rossato J.I., Bevilaqua L.R.M., Medina J.H., Izquierdo I., Cammarota M. (2008) *Neurobiology of Learning and Memory*, 89, 338-351.
- Nithianantharajah J., Hannan A.L. (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature reviews*. 7, 697-709.
- O'Connell C., O'Malley A., Regan C.M. (1997) Transient, learning-induced ultrastructural change in spatially-clustered dentate granule cells of the adult rat hippocampus. *Neuroscience*, 76(1) 55-62.
- Panula P., Sallinen V., Sundvik M., Kolehmainen J., Torkko V., Tittula A., Moshnyakov M., Podlasz P. (2006) Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish*, 3(2) 235-247.
- Praag H., Kempermann G., Gage F.H. (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nature reviews*. 1(3)191-198.
- Ravikumar B., Vacher C., Berger Z., Davies J.E., Luo S., Oroz L.G., Scaravilli F., Easton D.F., Duden R., O'Kane C.J., Rubinsztein D.C. (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genetics*. 36, 585–595.
- Rinkwitz S., Mourrain P., Becker T.S. (2011) Zebrafish: an integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Progress in Neurobiology*, 93, 231-243.
- Sarkar S., Ravikumar B., Floto R.A., Rubinsztein D.C. (2009) Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death and Differentiation*, 16, 46–56.

- Saverino C., Gerlai R. (2008) The social zebrafish: behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish. *Behavioural Brain Research*, 191(1), 77-87.
- Schratt G.M., Nigh E.A., Chen W.G., Hu L., Greenberg M.E. (2004) BDNF regulates the translational of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *The Journal of neuroscience*, 24(33) 7366-7377.
- Sengupta S., Peterson T.R., Sabatini D.M. (2010) Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors and stress. *Molecular Cell*, 40, 310-322.
- Slipczuk L., Bekinschtein P., Katche C., Cammarota M., Izquierdo I., Medina J.H. (2009) BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *Plos One*, 4(6) e6007.
- Sonenberg N., Hinnebusch A.G. (2009) Regulation of translational initiation in eucaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136, 731-745.
- Soulé J., Messaoudi E., Bramham C.R. (2006) Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. *Biochemical Society Transactions*. 34, 600-604.
- Spence R., Gerlach G., Lawrence C., Smith C. (2008) The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 83(1), 13-34.
- Squire L.R., Kandel E.R. (2003) *Memória: da mente às moléculas*. Tradução de: Carla Dalmaz e Jorge A. Quillfeldt. Porto Alegre: Artmed.
- Stanfel M.N, Shamieh L.S., Kaeberlein M., Kennedy B.K. (2009) The TOR pathway comes of age. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790, 1067-1074.
- Stewart A.M., Braubach O., Spitsbergen J., Gerladeli R., Kalueff A.V. (2014) Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends in Neuroscience*, 37(5), 264-278.
- Stewart A.M., Kalueff A.V. (2012) The developing utility of zebrafish models for cognitive enhancers research. *Current Neuropharmacology*, 10, 263-27.

- Swiech L., Perycz M., Malik A., Jaworski J. (2008) Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784, 116-132.
- Takei N., Inamura N., Kawamura M., Namba H., Hara K., Yonezawa K., Nawa H. (2004) Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *The Journal of Neuroscience*. 3;24, 9760-9769.
- Tang S.J., Schuman E.M. (2002) Protein synthesis in the dendrite. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 357, 521-529.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 18;3(7):RESEARCH0034
- Wullschleger S., Loewith R., Hall M.N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.
- Yang H., Rudge D.G., Koos J.D., Vaidialingam B., Yang H.J., Pavletich N.P. (2013) mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, 497, 217-224.
- Yu L., Tucci V., Kishi S., Zhdanova I.V. (2006) Cognitive aging in zebrafish. *Plos One*, 1(1) e14.
- Zhdanova I.V. (2006) Sleep in zebrafish. *Zebrafish*, 3, 215-226.