

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Tâmie Duarte

**NICOTINA PREVINE COMPORTAMENTO ANSIOGÊNICO EM
PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Santa Maria, RS

2019

Tâmie Duarte

**NICOTINA PREVINE COMPORTAMENTO ANSIOGÊNICO EM
PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg

Santa Maria, RS

2019

Duarte, Tâmie

Nicotina previne comportamento ansiogênico em peixe zebra (*Danio rerio*) / Tâmie Duarte.- 2019.

56 p.; 30 cm

Orientador: Denis Broock Rosemberg

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2019

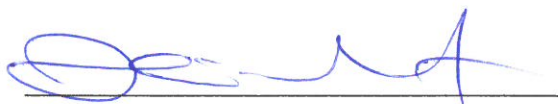
1. Nicotina 2. Comportamento 3. Ansiedade 4. Substância de alarme 5. Peixe-zebra I. Broock Rosemberg, Denis II. Título.

Tâmie Duarte

**NICOTINA PREVINE COMPORTAMENTO ANSIOGÊNICO EM
PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*)**

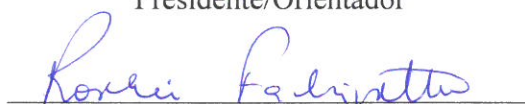
Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Aprovado em 22 de fevereiro de 2019:



Denis Broock Rosemberg, Dr. (UFSM)

Presidente/Orientador



Roselei Fachinetto, Dra. (UFSM)



Eduardo Pacheco Rico, Dr. (UNESC)

Santa Maria, RS

2019

DEDICATÓRIA

A gente sabe que a vida costuma ser dura. Dedico este trabalho para aqueles que como eu, achava que não daria conta. Suba o queixo, meta os pés, confie em você. Permita-se cair, mas não desista. Recomece quantas vezes for necessário. Você sentirá um grande orgulho quando conseguir chegar lá. Somos maiores e mais fortes do que a gente imagina.

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata à minha mãe Nelci, que me impulsionou a entrar no mestrado e em cada momento difícil foi meu amparo, foi o vento a favor e meu escudo de proteção. Ao meu padraсто Kurt, que sempre esteve na torcida para que esse sonho se tornasse realidade. Agradecer ao meu irmãozinho Davi, que embora ainda não saiba o significado disso tudo, foi e sempre será meu maior motivo de persistência.

Agradecer aos colegas do Laboratório de Neuropsicobiologia Experimental (LaNE), onde sempre houve muita troca de aprendizado e também de amizade. Aos professores que fizeram parte dessa jornada e transmitiram seu conhecimento para que também fosse parte do meu. Em especial meu orientador Denis Rosemberg, muito dedicado a todos seus alunos, para que cada um consiga fazer o seu melhor, principalmente pela paciência e confiança depositadas em mim. Aprendi e cresci demais nesse tempo junto de vocês.

Agradeço à CAPES pelo suporte financeiro e à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), que, por sua excelência em educação técnico-científica, forneceu todos os meios necessários pra que esta Dissertação de Mestrado fosse concretizada. Sinto-me honrada de ter feito parte desta instituição como aluna de graduação e pós-graduação.

Finalmente, obrigada a todos que nesses dois anos estiveram ao meu lado.

*“Nunca, nunca, nunca, nunca, nunca, nunca, nunca,
nunca desistir. Nunca, nunca.”*

(Martian Child)

RESUMO

Nicotina previne comportamento ansiogênico em peixe-zebra (*Danio rerio*)

AUTORA: TÂMIE DUARTE

ORIENTADOR: DR. DENIS BROOCK ROSEMBERG

A ansiedade exacerbada é um distúrbio neurocomportamental comum, a qual pode ser modulada por compostos que exercem efeitos ansiolíticos. Dentre eles está a nicotina, que possui uma ampla variedade de efeitos no sistema nervoso central e influencia diversos parâmetros fisiológicos e funções comportamentais. Devido à capacidade genética, aos neurotransmissores evolutivamente conservados e ao extenso repertório comportamental, o peixe-zebra (*Danio rerio*) tornou-se um organismo modelo emergente em estudos neuropsicofarmacológicos. Levando em consideração que o caráter ansiolítico da nicotina pode ajudar no desenvolvimento de melhores alvos terapêuticos para o tratamento da ansiedade, este trabalho se limita em focar na observação do comportamento ansiogênico do peixe-zebra quando exposto à uma situação aversiva (utilizando a substância de alarme) para analisar se o pré-tratamento com a nicotina de forma aguda é capaz de bloquear ou minimizar esses efeitos. Para este propósito, os peixes foram expostos individualmente a 1 mg/L de nicotina ou água dechlorada por 3 min e posteriormente transferidos para outros tanques na ausência ou presença de 3.5 mL/L da substância de alarme por 5 min. O comportamento dos peixes foram testados utilizando o teste do tanque novo e do aparato claro-escuro. Como esperado, a substância de alarme desencadeou comportamentos aversivos ao aumentar a permanência no fundo, congelamento, movimentos erráticos, escototaxia e episódios de avaliação de risco. A nicotina sozinha desencadeou comportamentos ansiolíticos uma vez que aumentou o tempo gasto na área superior do aquário, bem como a duração média de entrada no compartimento claro. Além disso, o pré-tratamento da nicotina preveniu respostas aversivas induzidas pela substância de alarme em ambos os testes. Em suma, estes resultados mostram efeitos benéficos da nicotina sobre as respostas ansiogênicas no peixe-zebra.

Palavras-chave: Nicotina, comportamento, ansiedade, substância de alarme, peixe-zebra.

ABSTRACT

Nicotine prevents anxiety-like behavioral responses in zebrafish

AUTHOR: TÂMIE DUARTE

ADVISOR: DR. DENIS BROOCK ROSEMBERG

Exacerbated anxiety is a common neurobehavioral disorder, which can be modulated using anxiolytic compounds. Nicotine has a wide variety of effects on the central nervous system influencing various physiological parameters and behavioral functions. Due to its genetic ability, evolutionarily conserved neurotransmitters and extensive behavioral repertoire, the zebrafish (*Danio rerio*) has emerged as an useful model organism in psychopharmacological research. Because understanding the anxiolytic character of nicotine help elucidate therapeutic targets for treating anxiety, this work is limited to focusing on the observation of the anxiogenic behavior of zebrafish when exposed to an aversive situation (using the alarm substance) to analyze whether acute nicotine pretreatment can block and/or minimize these effects. For this purpose, the fish were individually exposed to 1 mg/L nicotine or non-chlorinated water for 3 min and then transferred to other tanks in the absence or presence of 3.5 mL/L alarm substance for 5 min. The behavior of fish was tested using the novel tank diving and light-dark tests. As expected, alarm substance triggered aversive behaviors by increasing the permanence in the bottom, freezing, erratic movements, scototaxis, and risk assessment episodes. Nicotine alone triggered anxiolytic behaviors by increasing the time spent in top area and the average duration of entry into the lit compartment. Furthermore, nicotine prevented alarm substance-induced aversive responses in both tests. Overall, these results show the beneficial effects of nicotine on the anxiogenic responses of zebrafish.

Keywords: Nicotine, behavior, anxiety, alarm substance, zebrafish.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>et al</i>	Expressão em latim que significa "e outros"
mAChR	Receptores muscarínicos de Acetilcolina
nAChR	Receptores nicotínicos de Acetilcolina
SA	Substância de Alarme
SNC	Sistema Nervoso Central
WHO	“World Health Organization”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura cerebral humana dividida em Neocortex, Sistema Límbico e Cérebro Repteliano.....	15
Figura 2: Isômeros da molécula de nicotina: (A) (S) - (-) – nicotina e letra (B) (R) - (+) – nicotina.....	16
Figura 3: Principal via de transformação da Nicotina e proporções estimadas dos metabólitos excretados na urina.....	18
Figura 4: Foto do peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>).....	19
Figura 5: Ilustração representativa da relação de similaridade morfofisiológica de animais modelos (mosca das frutas, peixes e roedores), utilizados em pesquisa comparados ao ser humano.....	19
Figura 6: Proposta de homologia estrutural entre peixes-zebra e humanos. (A) Peixes-zebra adultos I. telencéfalo, cérebro e II. medula espinhal (B) Humanos adultos i., ii. telencéfalo (prosencefalo anterior), cérebro e iii. espinha medial (transversal). Dois hemisférios foram usados (i e ii) para ilustrar os gânglios basais, o hipocampo e a amígdala. As regiões associadas a distúrbios do desenvolvimento (azul) incluem estruturas corticais e subcorticais que são vitais para a linguagem, comunicação, memória, emoção e capacidade intelectual. Regiões conservadas associadas a doenças degenerativas dos axônios (vermelho) incluem partes do circuito motor e do nervo óptico. Am: amígdala; BG: gânglios basais; Ce: cerebelo; CTX: córtex; Dc: pálido central dorsal; Dl: pálido lateral dorsal; Dm: pálido medial dorsal; DTele: telencéfalo dorsal; Hip: hipocampo; Hy: hipotálamo; MN: neurônio motor; PT: tubérculo posterior; Th: tálamo; ON: nervo óptico.....	21
Figura 7: Extração da substância de alarme.....	22
Figura 8: Aparatos utilizados. (A) Teste do tanque novo, (B) Aparato claro-escuro	24
Figura 9: Parâmetros medidos no teste do tanque novo: (A) distância percorrida, (B) ângulo de giro absoluto, (C) transições e tempo gasto no topo, (D) latência para entrar no topo, (E) congelamento e (F) movimentos erráticos.....	25
Figura 10: Parâmetros medidos no teste do aparato claro-escuro: (A) avaliação de risco para o compartimento branco, (B) latência para a entrada no lado preto, (C) tempo no lado branco e (D) número de cruzamentos.....	26

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	13
2. INTRODUÇÃO.....	14
2.1 Ansiedade.....	14
2.2 Nicotina.....	16
2.3 Peixe-zebra como organismo modelo.....	19
2.4 Substância de alarme.....	22
2.5 Testes para avaliar ansiedade em peixe-zebra.....	23
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4. MANUSCRITO CIENTÍFICO.....	28
5. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	47
6. CONCLUSÃO FINAL.....	47
7. PERSPECTIVAS DO ESTUDO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA.....	54
ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO CIENTÍFICO.....	55
ANEXO C – LISTA DOS TRABALHOS COLABORATIVOS DESENVOLVIDOS DURANTE O MESTRADO.....	56

1. APRESENTAÇÃO

Esta Dissertação aborda os efeitos neurocomportamentais em peixe-zebra mediados pela exposição aguda à nicotina quando pré-tratados com substância de alarme. Ela encontra-se estruturada da seguinte forma:

INTRODUÇÃO: Revisão da literatura com caracterização dos temas abordados na Dissertação.

OBJETIVOS: Objetivo geral e específicos do trabalho.

METODOLOGIA, RESULTADOS e DISCUSSÃO: Serão apresentados na forma de um Manuscrito Científico.

CONCLUSÃO: Comentários gerais sobre os principais achados.

PERSPECTIVAS: Apresentação das possibilidades de novos estudos a partir dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS: Lista das referências utilizadas na introdução da Dissertação.

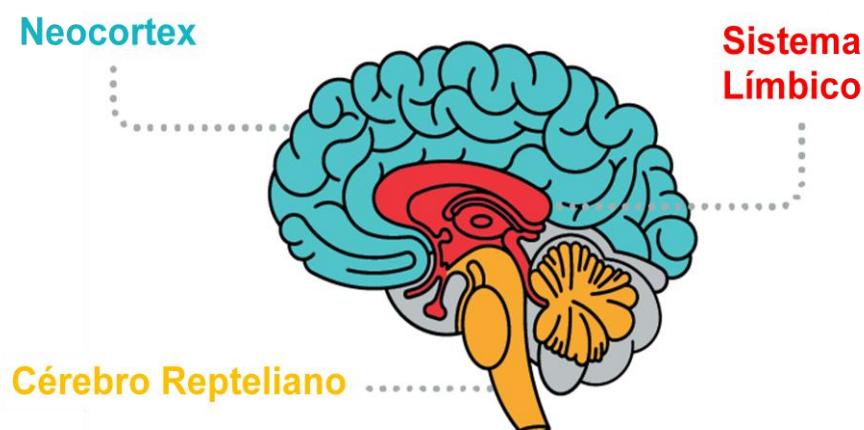
2. INTRODUÇÃO

2.1 Ansiedade

A ansiedade é uma emoção normal e, na maioria das vezes, saudável. Pesquisas pré-clínicas demonstram que os estados de ansiedade possuem relação com os mecanismos de defesa dos animais diante de estímulos ameaçadores ou em situações de perigo (GUO, 2004; GRAEFF e HETEM, 2004). Quando um organismo enfrenta gatilhos potencialmente prejudiciais ou preocupantes, os sentimentos de ansiedade além de normais, também são necessários para a sobrevivência (MARTIN *et al.*, 2009). Desde os primórdios da humanidade, a aproximação dos predadores ou de alguma ameaça eminente desencadeiam alarmes no corpo que se tornam perceptíveis através de batimentos cardíacos elevados, sudorese e aumento da sensibilidade ao ambiente. O perigo provoca uma descarga de adrenalina, que por sua vez desencadeia essas reações ansiosas em um processo chamado resposta de "luta ou fuga", pois prepara os animais para o confronto físico ou fuga de quaisquer riscos potenciais (BISHOP, 2007). Atualmente, o comportamento de ansiedade em humanos envolve preocupações permeadas em torno do trabalho, dinheiro, vida familiar, saúde e outras questões cruciais que exigem a atenção de uma pessoa, sem necessariamente exigir a reação de "luta ou fuga". Porém, o nervosismo diante de um importante evento da vida ou durante uma situação difícil é um eco natural dessa reação (MARTIN *et al.*, 2009).

Em 1980, MAY definiu ansiedade como uma relação existente entre o indivíduo, o ambiente ameaçador e os processos neurofisiológicos decorrentes desta relação. Desse modo, a ansiedade implica na ocorrência de uma condição aversiva, algum grau de incerteza ou dúvida do organismo em uma dada situação (STEWART *et al.*, 2011a). No entanto, quando há níveis desproporcionais de ansiedade, ela pode se tornar um distúrbio médico (GUO, 2004). Conhecer a diferença entre os sentimentos normais de ansiedade e um transtorno de ansiedade pode ajudar a pessoa a identificar e tratar a condição. O transtorno de ansiedade altera a forma do processo de emoções e comportamentos. Dentre os sintomas físicos e psicológicos destacamos medos irracionais, pânico, preocupação, insônia, tensão muscular e dores (BANDELOW e MICHAELIS, 2015; BISHOP, 2007). Embora esses efeitos possam ser naturais no cotidiano, indivíduos com distúrbios de ansiedade irão experimentá-los em níveis persistentes ou extremos (GUO, 2004; SOARES *et al.*, 2018). Acredita-se que os sintomas resultem, em parte, da ruptura do equilíbrio do "sistema límbico" (**Figura 1**), a unidade responsável pelas emoções e comportamentos sociais (BISHOP, 2007; MARTIN *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2018).

Figura 1: Estrutura cerebral humana dividida em Neocortex, Sistema Límbico e Cérebro Reptiliano.



Fonte: da autora.

Os transtornos mentais não tratados são responsáveis por interferirem em até 13% na função diária da população (WHO, 2013) e desses, estima-se que mais de 260 milhões de pessoas sejam afetadas pelos distúrbios de ansiedade (WHO, 2017) (BANDELOW e MICHAELIS, 2015). Existem vários tipos de transtornos de ansiedade, incluindo transtorno de ansiedade generalizada, transtorno do pânico, fobias, mutismo seletivo e transtorno de ansiedade de separação (BANDELOW e MICHAELIS, 2015).

Uma das questões centrais da pesquisa em neuropsiquiatria é como genes, vias moleculares e padrões de conectividade cerebrais desencadeiam e modulam o comportamento da ansiedade (BISHOP, 2007; SUVEG *et al.*, 2010; GUO, 2004). A amígdala é o centro identificador de perigo, a qual é responsável pela expressão do medo e ansiedade, bem como por comportamentos defensivos específicos (BISHOP, 2007; SOARES *et al.*, 2018). O hipocampo tem controle inibitório tônico sobre o sistema de resposta ao estresse hipotalâmico e desempenha um papel no “feedback” negativo para o eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal. O volume do hipocampo e a neurogênese têm sido implicados na sensibilidade ao estresse e na resiliência em relação aos transtornos de ansiedade (MARTIN *et al.*, 2009).

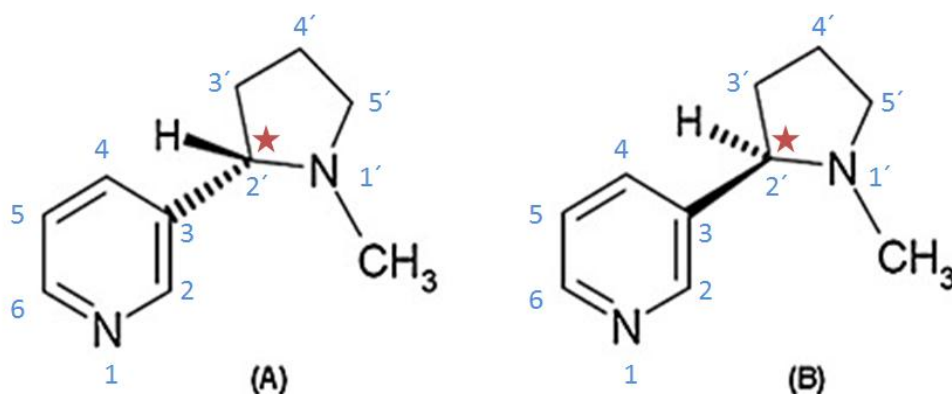
Os tratamentos envolvem uma combinação de psicoterapia, terapia comportamental e medicação (BANDELOW e MICHAELIS, 2015). Entre os fármacos utilizados estão antidepressivos, benzodiazepínicos, betabloqueadores e outros compostos com ação ansiolítica (SINGER *et al.*, 2016).

2.2 Nicotina

A nicotina é o componente majoritário do tabaco, mas também pode ser encontrada em baixas quantidades em batatas, tomates e berinjelas (HUKKANEN, JACOB e BENOWITZ, 2005). Na folha de tabaco, existem mais de 20 tipos de alcalóides e a nicotina é responsável por constituir 98% do total (KATAOKA *et al.*, 2008). Em 1928, Posselt e Reimann conseguiram isolar a nicotina e iniciar os estudos farmacológicos com essa substância (RUSSO *et al.*, 2011). Ela é um alcaloide composto por piridina e um anel de pirrolidina [1-metil-2-(3-piridil) pirrolidina] que exerce uma variedade de efeitos benéficos e toxicológicos no SNC (SWAN e LESSOV-SCHLAGGAR, 2007). Devido à presença de um carbono quiral, essa molécula possui duas formas enantioméricas: o (S) - (-) – nicotina, o isômero dominante presente no tabaco e o (R) - (+) – nicotina, que é fisiologicamente menos ativo (concentração em torno de 0,1 a 0,6%), porém mais tóxico (**Figura 2**) (CLAYTON *et al.*, 2013; HUKKANEN, JACOB e BENOWITZ, 2005; MAJDI *et al.*, 2017). O teor de nicotina (R) da fumaça do tabaco é maior (até 10%), presumivelmente resultante da racemização ocorrida durante a combustão (HUKKANEN, JACOB e BENOWITZ, 2005).

No seu estado puro, a nicotina é um líquido incolor, volátil e intensamente alcalino, que se torna amarelo pálido a castanho escuro na exposição ao ar, causando um cheiro de tabaco característico. É um químico muito tóxico, potencialmente letal (JILOHA, 2010) e, em humanos, a toxicidade pode ser observada nas doses de 1–4 mg e ser fatal nas doses entre 40–60 mg (GALVÃO, GALVÃO, MOREAU, 2014).

Figura 2: Isômeros da molécula de nicotina: (A) (S) - (-) – nicotina e letra (B) (R) - (+) – nicotina



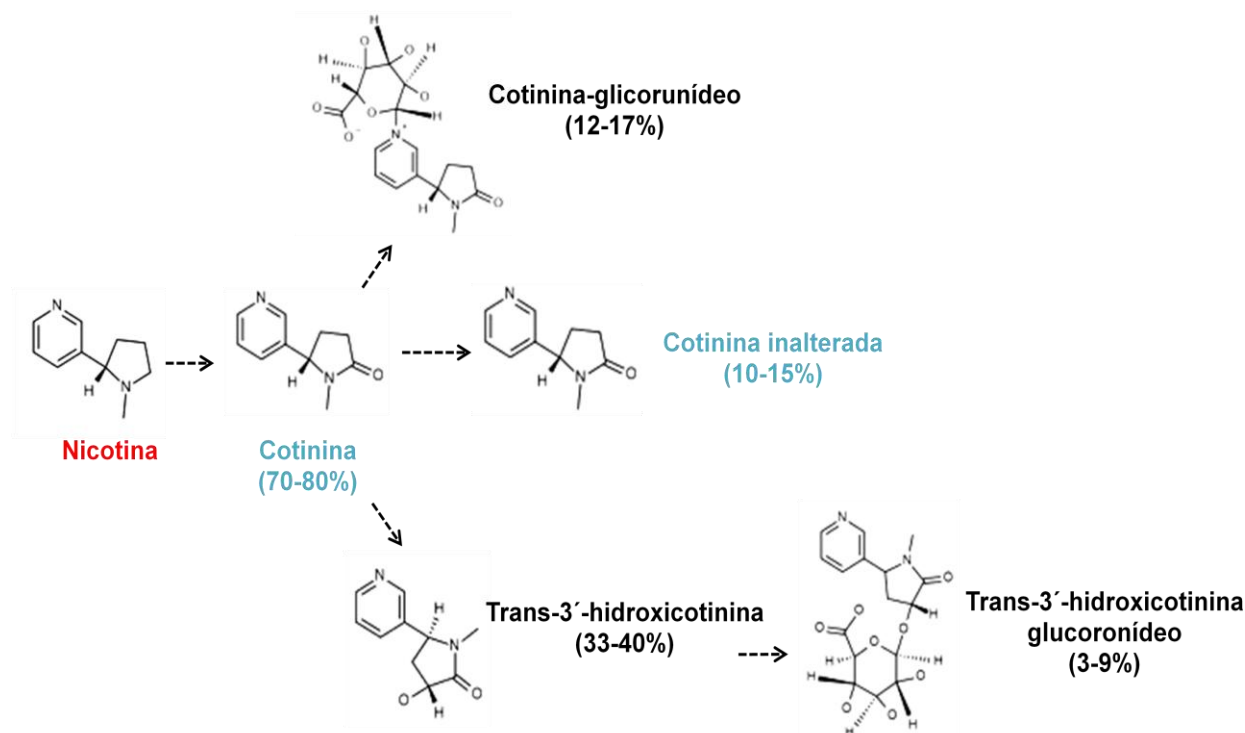
Fonte: adaptado de CLAYTON *et al.*, (2013).

Devido ao fato da nicotina ser muito solúvel em lipídios, ela pode ser absorvida pela mucosa bucal, nasal e inalada pelos pulmões (KATAOKA *et al.*, 2008). O fumo do tabaco, entra na corrente sanguínea através dos pulmões, enquanto a nicotina no tabaco sem combustão atravessa a membrana mucosa da boca e do nariz ou da pele. Sua absorção nas membranas biológicas também dependem do pH: em cachimbos e charutos possui o pH 6.5 ou maior, encontrando-se predominantemente na forma não protonada e sendo rapidamente absorvida pela mucosa bucal. Já na fumaça do cigarro, devido ao pH ser mais ácido (~5.5 a 6) a nicotina permanece na forma protonada e, por isso, há pouca absorção bucal. Quando a fumaça do tabaco atinge as pequenas vias aéreas e alvéolos do pulmão, a nicotina é rapidamente absorvida (HUKKANEN, JACOB e BENOWITZ, 2005) e pode atingir o cérebro em apenas 7 segundos (JILOHA, 2010). A capacidade de ligação do receptor nicotínico é maior em fumantes em comparação aos não-fumantes (PERRY *et al.*, 1999). Tal aumento de afinidade é causado pelo maior número de receptores colinérgicos nicotínicos no cérebro de fumantes (HUKKANEN, JACOB e BENOWITZ, 2005).

Após a absorção, a nicotina entra na corrente sanguínea onde, em pH 7.4, é cerca de 69% ionizada e 31% não ionizada. A forma não carregada pode atravessar as membranas lipídicas e modificar diretamente a sinalização intracelular, enquanto a forma carregada se liga aos receptores nicotínicos (SUBRAMANIYAN e DANI, 2015). Deste modo, a nicotina produz uma ampla variedade de efeitos no sistema nervoso central (SNC), influenciando um diversos processos fisiológicos como locomoção, aprendizagem, memória e ansiedade (GALVÃO, GALVÃO e MOREAU, 2014).

Pelas enzimas hepáticas, a nicotina é biotransformada em uma série de metabólitos (80 a 90%) e em menor grau nos pulmões ou rins. A cotinina é o principal metabólito (**Figura 3**), encontrado tanto em fumantes ativos quanto passivos (BENOWITZ e JACOB, 1994; HUKKANEN, JACOB e BENOWITZ, 2005). Pelo fato da cotinina ser muito mais polar que a nicotina, sua metabolização é mais lenta e deste modo possui uma meia-vida maior (16–20 horas) do que a da nicotina (1–4 horas) (BENOWITZ, 1986; BERGEN e CAPORASO, 1999). Consequentemente, a cotinina é bastante utilizada como um marcador quantitativo da exposição à nicotina, podendo ser detectada em vários fluidos biológicos como soro, plasma, urina, saliva, cabelo e unhas (GALVÃO, GALVÃO e MOREAU, 2014). Porém, ao contrário da nicotina, foi relatado que esse metabólito tem pouco ou nenhum efeito sobre o desempenho cognitivo em humanos, mas que possui a capacidade de modificar os sintomas de abstinência (HUKKANEN, JACOB e BENOWITZ, 2005).

Figura 3: Principal via de transformação da nicotina e proporções estimadas dos metabólitos excretados na urina.



Fonte: adaptado de GALVÃO, GALVÃO e MOREAU, (2014).

Efeitos tóxicos e farmacológicos causados pela exposição à nicotina têm sido frequentemente relatados na literatura (HENNINGFIELD, COHEN e SLADE, 2011; JILOHA, 2010; SUBRAMANIYAN e DANI, 2015). Por outro lado, tanto a nicotina quanto outros agonistas nicotínicos, em doses baixas têm demonstrado efeitos benéficos potenciais que incluem uma melhora na cognição (MAJDI, KAMARI, VAFAEE e SADIGH-ETEGHAD, 2017; ZIANI *et al.*, 2018). Em modelos de ansiedade, por exemplo, a nicotina tem demonstrado um papel importante devido a sua ação ansiolítica após sua exposição por um curto período de tempo (KLEE *et al.*, 2011; LEVIN, BENCAN e CERUTTI, 2007; SINGER *et al.*, 2016). Estudos demonstraram que humanos em situações aversivas aumentam a taxa de tabagismo (BENOWITZ, 1986) como uma busca por alívio da ansiedade e diminuição da reatividade a estímulos que causam estresse (HENNINGFIELD, COHEN e SLADE 1991). Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que há 1.3 bilhão de fumantes no mundo, e que o consumo médio chega a 5.5 cigarros por habitante (GALVÃO, GALVÃO e MOREAU, 2014).

2.3 Peixe-zebra como organismo modelo

As buscas pela compreensão dos mecanismos neurobiológicos envolvidas nas respostas comportamentais dependem da renovação de abordagens científicas. O peixe-zebra (*Danio rerio*), um pequeno teleósteo (3-4 cm) de água doce da família *Cyprinidae* que tem como característica a presença de listras horizontais nas laterais do corpo (**Figura 4**) (SCHILLING, 2002), tornou-se um promissor organismo modelo em pesquisa de neurofarmacologia, neurotoxicologia e neurocomportamental (FONTANA *et al.*, 2016; GUO, 2004; KALUEFF, STEWART e GERLAI, 2014; RICO *et al.*, 2011).

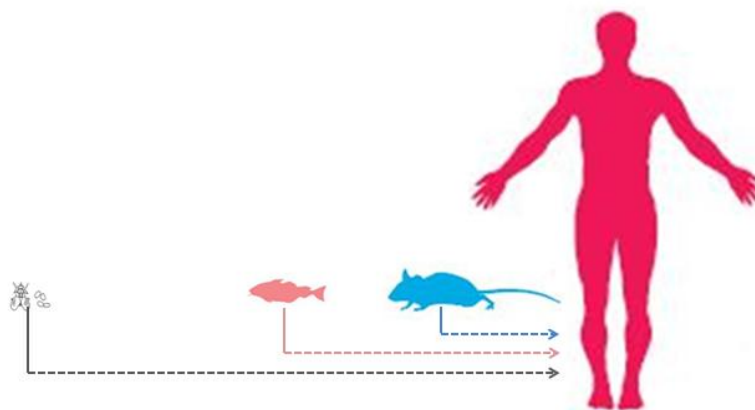
Figura 4: Foto do peixe-zebra (*Danio rerio*)



Fonte: Denigma, (2012)

Por ser um vertebrado, o peixe-zebra encontra-se mais próximo aos seres humanos do que outros organismos invertebrados, tais como leveduras, vermes ou a mosca das frutas (**Figura 5**) (KLEE *et al.*, 2011).

Figura 5: Ilustração representativa da relação de similaridade morfofisiológica de animais modelos (mosca das frutas, peixes e roedores), utilizados em pesquisa comparados ao ser humano.



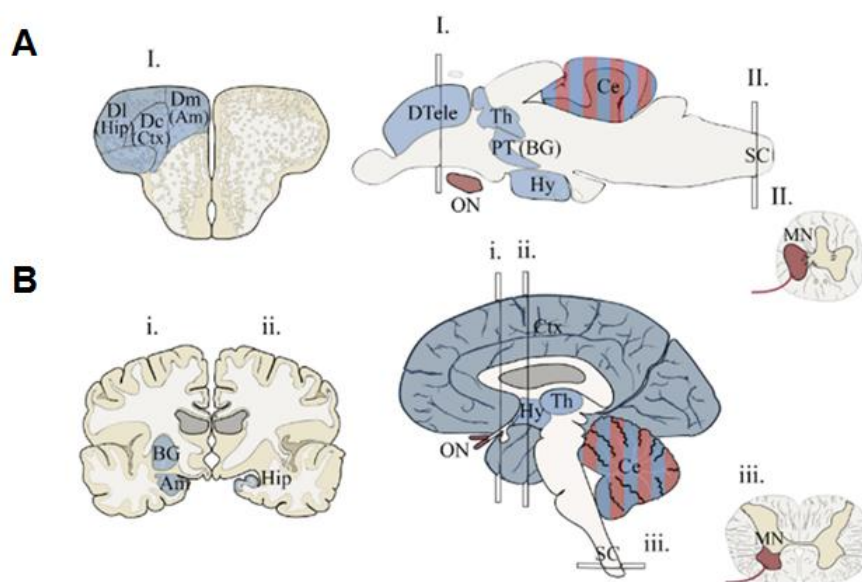
Fonte: da autora.

Apesar das diferenças morfológicas e anatômicas, o SNC do peixe-zebra e dos mamíferos apresenta regiões com similaridade funcional, possui estruturas cerebrais correspondentes, e diversos sistemas hormonais e de neurotransmissores (colinérgico, GABAérgico, serotoninérgico, dopaminérgico, adenosinérgico, noradrenérgico, histaminérgico, purinérgico, glicinérgico e nitrérgico) já foram caracterizados na espécie (BARROS *et al.*, 2008; GUO, 2004; KOZOL *et al.*, 2016; RICO *et al.*, 2011; STEWART *et al.*, 2011a; 2011b). O sistema colinérgico tem um papel fundamental em várias funções vitais (MESULAM *et al.*, 2002) e seus receptores são divididos em duas classes: muscarínicos (mAChR) e nicotínicos (nAChRs) (RICO *et al.*, 2011). Ambas subunidades também são expressos nesta espécie (ZIRGER *et al.*, 2003), sendo os nAChRs envolvidos em mecanismos de recompensa no SNC, o que implica, em grande parte, na dependência em tabaco e nicotina (PICCIOTTO *et al.*, 1998).

Embora o peixe-zebra não apresente núcleo *accumbens* e área tegmentar ventral semelhante aos mamíferos, projeções dopaminérgicas ao prosencéfalo se equiparam ao sistema dopaminérgico mesolímbico (COLLIER *et al.*, 2014, KOZOL *et al.*, 2016). A região do telencéfalo conhecida como pálido lateral é homóloga ao hipocampo (BARROS *et al.*, 2008) e o telencéfalo pode corresponder ao sistema límbico de humanos. Evidências demonstram uma equivalência funcional do telencéfalo dorsomedial do peixe-zebra com a amígdala em mamíferos (SALAS *et al.*, 2006) (**Figura 6**). Além disso, o peixe-zebra dispõe mais de 26.000 genes codificadores de proteínas, com quase 71% desses genes tendo ortólogos em humanos (HOWE *et al.*, 2013), possuindo uma similaridade de nucleotídeos em 70–80% e de aminoácidos entre 60–90% (GERLAI, 2010; SUBBIAH e KAR, 2013). Quando comparamos peixe-zebra e humanos, a observação de efeitos farmacológicos em alvos moleculares revela uma notável semelhança no mecanismo de ação (GUO, 2004; RICO *et al.*, 2011), especialmente levando em conta o sítio ativo de enzimas, canais iônicos e receptores (SCHAAF *et al.*, 2008).

Importantemente, o peixe-zebra possui comportamentos relativamente complexos, inclusive com relevância para modelos relacionados a estudos translacionais de doenças humanas (CACHAT *et al.*, 2010; EGAN *et al.*, 2009; GUO, 2004). Essas semelhanças permitem que os resultados em testes com peixe-zebra sejam semelhantes aos observados em mamíferos (GUO, 2004; MAXIMINO *et al.*, 2018).

Figura 6: Proposta de homologia estrutural entre peixes-zebra e humanos. **(A)** Peixes-zebra adultos I. telencéfalo, cérebro e II. medula espinhal **(B)** Humanos adultos i., ii. telencéfalo (prosencefalo anterior), cérebro e iii. espinha medial (transversal). Dois hemisférios foram usados (i e ii) para ilustrar os gânglios basais, o hipocampo e a amígdala. As regiões associadas a distúrbios do desenvolvimento (azul) incluem estruturas corticais e subcorticiais que são vitais para a linguagem, comunicação, memória, emoção e capacidade intelectual. Regiões conservadas associadas a doenças degenerativas dos axônios (vermelho) incluem partes do circuito motor e do nervo óptico. Am: amígdala; BG: gânglios basais; Ce: cerebelo; CTX: córtex; Dc: pálido central dorsal; Dl: pálido lateral dorsal; Dm: pálido medial dorsal; DTele: telencéfalo dorsal; Hip: hipocampo; Hy: hipotálamo; MN: neurônio motor; PT: tubérculo posterior; Th: tálamo; ON: nervo óptico.



Fonte: KOZOL *et al.*, (2016).

Não obstante, o manejo do peixe-zebra e a manutenção das instalações são simples e econômicas, um grande número de animais pode ser abrigado em áreas relativamente pequenas, e fenótipos comportamentais robustos podem ser estudados e manipulados tanto em larvas quanto em adultos (COLLIER *et al.*, 2014; GUO, 2004; SCHILLING, 2002; STEWART *et al.*, 2011b). Outro fator importante é sua eficiente taxa de absorção de substâncias através da água (SCHMIDEL *et al.*, 2014). Evidências demonstram uma alta sensibilidade deste organismo modelo a manipulações farmacológicas, pois responde a uma ampla gama de drogas psicotrópicas (CACHAT *et al.*, 2010), incluindo ansiolíticos e drogas ansiogênicas (QUADROS *et al.*, 2016; STEWART *et al.*, 2011b), bem como aos estressores agudos e crônicos (DØVING e LASTEIN 2009; FULCHER *et al.*, 2017).

2.4 Substância de Alarme

Cada animal possui comunicações específicas (tátil, acústica, química) para diferentes finalidades. Em várias espécies de peixes, a importância de pistas visuais na determinação da ameaça ambiental e subsequente evitação de predadores é clara (CHIVERS e SMITH, 1998; HINTZ *et al.*, 2017). A comunicação química no ambiente aquático provoca ajustes comportamentais e mudanças que exigem a transferência de informações adaptativas entre peixes doadores e receptores. Esta comunicação tem diferentes objetivos: demarcação de território, atração sexual, sinalização de alimentos, sinais de perigo, entre outros (LILEY, 1982).

Os métodos e recursos disponíveis para alertar coespecíficos variam de acordo com o contexto e fatores. A comunicação química desempenha um papel essencial, facilitando a prevenção de predadores. Em peixes da superordem *Ostariophysi*, as células da epiderme denominadas “club cells” produzem uma substância de alarme (SA) (HINTZ *et al.*, 2017; MAXIMINO *et al.*, 2018b) que é liberada da epiderme do peixe quando ocorre lesão e pode ser extraída em laboratório a partir de peixes doadores previamente eutanasiados (**Figura 7**). A SA se difunde através da água e se liga a receptores olfativos de coespecíficos. Isso faz com que os peixes receptores apresentem uma série de comportamentos como luta, resposta defensiva exacerbada, fuga ou formação de cardume (EGAN *et al.*, 2009; MAXIMINO *et al.*, 2018b).

Figura 7: Extração da SA.



Fonte: da autora.

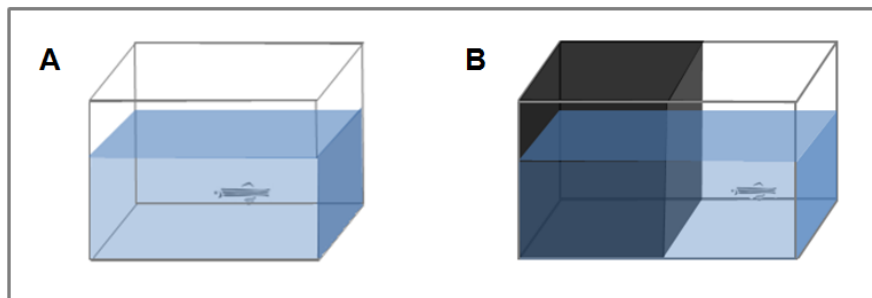
A utilização de agentes químicos como a SA para induzir respostas exacerbadas de comportamentos defensivos é uma importante ferramenta para a investigação de respostas aversivas, uma vez que mimetiza sua liberação em uma situação de ataque por um predador. Deste modo, a exposição à SA é um modelo químico capaz de produzir respostas semelhantes ao medo e aumentar o comportamento do tipo ansiedade em peixe-zebra (HINTZ *et al.* 2017; LIMA *et al.*, 2016), modificando o comportamento exploratório, a tigmotaxia, aumentando a geotaxia e a preferência por ambientes escuros em busca de proteção, também chamada de escototaxia (QUADROS *et al.*, 2016; MAXIMINO *et al.*, 2010).

Apesar da composição exata do SA ser desconhecida, sua composição é uma mistura complexa de substâncias (MAXIMINO *et al.*, 2018b) que desencadeiam respostas de alarme específicas (DØVING e LASTEIN, 2009). Em peixe-zebra, a molécula de hipoxantina 3-N óxido (H_3NO) induz alguns, mas não todos, componentes da reação de alarme (HINTZ *et al.* 2017; MATHURU *et al.*, 2012). A resposta de alarme é mediada por neurônios ciliados que se projetam para o bulbo olfatório, e sugere-se que em diferentes espécies de peixes a detecção dos odores do alarme seja mediada por neurônios sensoriais particulares. Vertebrados podem detectar substâncias químicas no ambiente através dos sentidos olfativo e gustativo (OKA e KORSCHING, 2011). Existem três tipos de neurônios receptores olfativos: neurônios ciliados, neurônios microvilosos e células da cripta (WHITLOCK, 2006; OKA e KORSCHING, 2011). Estes sistemas empregam várias famílias de receptores acoplados à proteína G (MOMBAERTS, 2004) e ao contrário dos mamíferos, em peixes, um mesmo neurônio sensorial pode expressar mais de uma proteína receptora (KERMEN *et al.*, 2013). Estudos utilizando imuno-histoquímica já mostraram que as proteínas G são expressas nos neurônios das criptas do peixe-zebra (OKA e KORSCHING, 2011).

2.5 Testes para avaliar ansiedade em peixe-zebra

O peixe-zebra tem emergido como organismo modelo para estudos do comportamento do tipo ansiedade, pois reage aos modelos de estresse e ansiedade por alterações endócrinas e comportamentais (SOARES *et al.*, 2018). Nesse contexto, alguns modelos foram validados e são bem estabelecidos para o comportamento semelhante à ansiedade. Dentre eles, destacam-se o teste do tanque novo (EGAN *et al.*, 2009; STEWART, *et al.*, 2011a; LEVIN, BENCAN e CERUTTI, 2007) e o teste de preferência claro-escuro (MAGNO *et al.*, 2015; QUADROS *et al.*, 2016), cujos aparatos são representados na **Figura 8**.

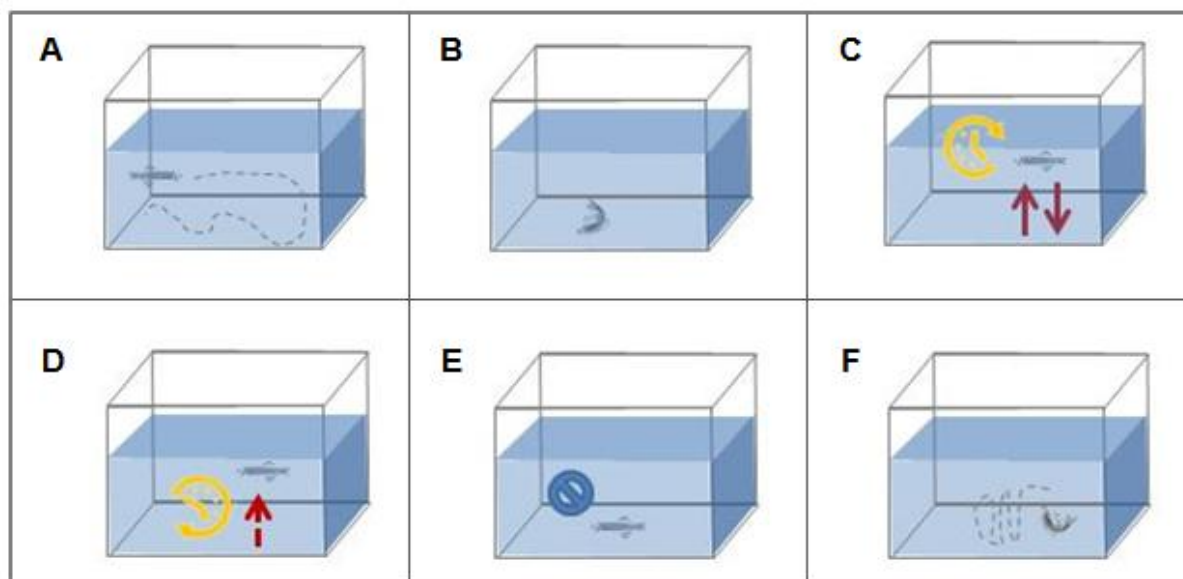
Figura 8: Aparatos utilizados. (A) Teste do tanque novo, (B) Aparato claro-escuro.



Fonte: da autora.

O teste do tanque novo explora a tendência natural dos peixes em gastar 70–85% do primeiro minuto na parte inferior de um novo aparato, onde gradualmente sua preferência é reduzida pela exploração das partes superficiais do tanque de teste (LEVIN, BENCAN e CERUTTI, 2007). Dessa maneira, o animal é exposto a um novo aparato, e, uma vez que o peixe-zebra tem a tendência de buscar proteção em um ambiente não familiar, mergulha e permanece na parte inferior (geotaxia) enquanto são habituados ao novo ambiente (CACHAT *et al.*, 2010; EGAN *et al.*, 2009; STEWART *et al.*, 2011a). A ansiedade neste teste pode ser medida por um menor número de transições e tempo gasto no topo, maior latência para entrar no topo, maior número e duração de episódios de congelamento, maior número e duração de movimentos erráticos, além de ser modulada pela atividade locomotora, a qual pode ser quantificada pela distância percorrida, ângulo de giro absoluto e velocidade máxima (**Figura 9**) (CACHAT *et al.*, 2010; EGAN *et al.*, 2009; LEVIN, BENCAN e CERUTTI, 2007; STEWART *et al.*, 2011b).

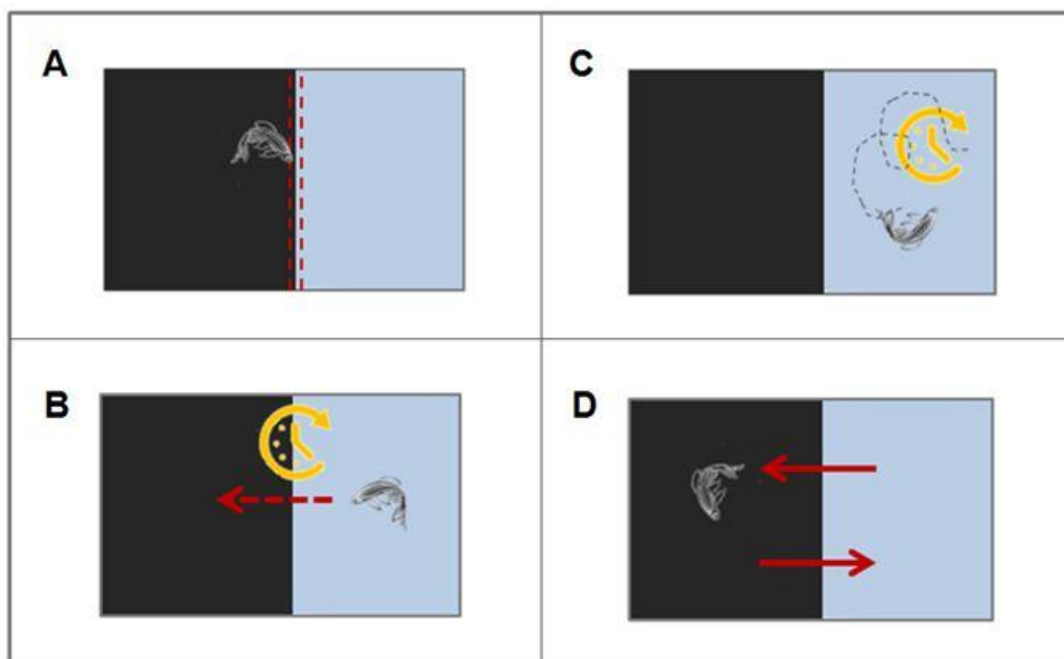
Figura 9: Parâmetros medidos no teste do tanque novo: (A) distância percorrida, (B) ângulo de giro absoluto, (C) transições e tempo gasto no topo, (D) latência para entrar no topo, (E) congelamento e (F) movimentos erráticos.



Fonte: da autora.

No teste claro-escuro, as paredes do compartimento preto podem dar sensação de oportunidade de fuga e proteção de predadores como uma espécie de camuflagem, enquanto as paredes do compartimento claro tendem a ser aversivas (MAXIMINO *et al.*, 2010). A preferência por ambientes escuros em detrimento dos mais claros (escototaxia) é um índice que reflete um componente do tipo ansiedade no peixe-zebra (MAGNO *et al.*, 2015). Sendo assim, no aparato claro-escuro o peixe-zebra geralmente prefere o lado escuro de um tanque preto e branco, com apenas algumas incursões para o compartimento claro (MAXIMINO *et al.*, 2010, QUADROS *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2018). Assim, efeitos “ansiolíticos” geralmente são observados como menor quantidade de avaliação de risco, maior latência para o compartimento preto, menor tempo de permanência no lado escuro e diminuição no número de entradas para o compartimento preto (**Figura 10**) (GUO, 2004; MAGNO *et al.*, 2015; QUADROS *et al.*, 2016).

Figura 10: Parâmetros medidos no teste claro-escuro: **(A)** avaliação de risco para o compartimento branco, **(B)** latência para a entrada no lado preto, **(C)** tempo no lado branco e **(D)** número de cruzamentos.



Fonte: da autora.

Dessa maneira, considerando os efeitos ansiolíticos promovidos pela nicotina em vertebrados, torna-se importante avaliar se a exposição aguda à nicotina previne respostas aversivas em peixe-zebra utilizando diferentes tarefas comportamentais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do pré-tratamento com nicotina sobre o comportamento do tipo ansiedade em peixe-zebra.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a ação promovida pela nicotina em parâmetros locomotores e de motricidade;
- Avaliar as alterações comportamentais do peixe-zebra após uma situação aversiva gerada pela SA;
- Analisar se a exposição prévia à nicotina modula o efeito da SA;
- Examinar o padrão das respostas defensivas dos peixes utilizando os testes do tanque novo e do aparato claro-escuro.

4. MANUSCRITO CIENTÍFICO

Nicotine prevents anxiety-like behavioral responses in zebrafish

Tâmie Duarte, Barbara D. Fontana, Talise E. Müller,
Kanandra T. Bertoncello, Julia Canzian, Denis B. Rosemberg

*O manuscrito apresenta-se na forma ao qual foi submetido ao periódico
Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*

Nicotine prevents anxiety-like behavioral responses in zebrafish

Tâmie Duarte^{a,b}, Barbara D. Fontana^c, Talise E. Müller^{a,b}, Kanandra T. Bertencello^{a,b}, Julia Canzian^a, Denis B. Rosemberg^{a,b,d*}

^a *Laboratory of Experimental Neuropsychobiology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.*

^b *Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.*

^c *Brain and Behaviour Laboratory, School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Portsmouth, Old St Michael's Building, Portsmouth, PO1 2DT, UK.*

^d *The International Zebrafish Neuroscience Research Consortium (ZNRC), 309 Palmer Court, Slidell, LA 70458, USA.*

*Correspondence to:

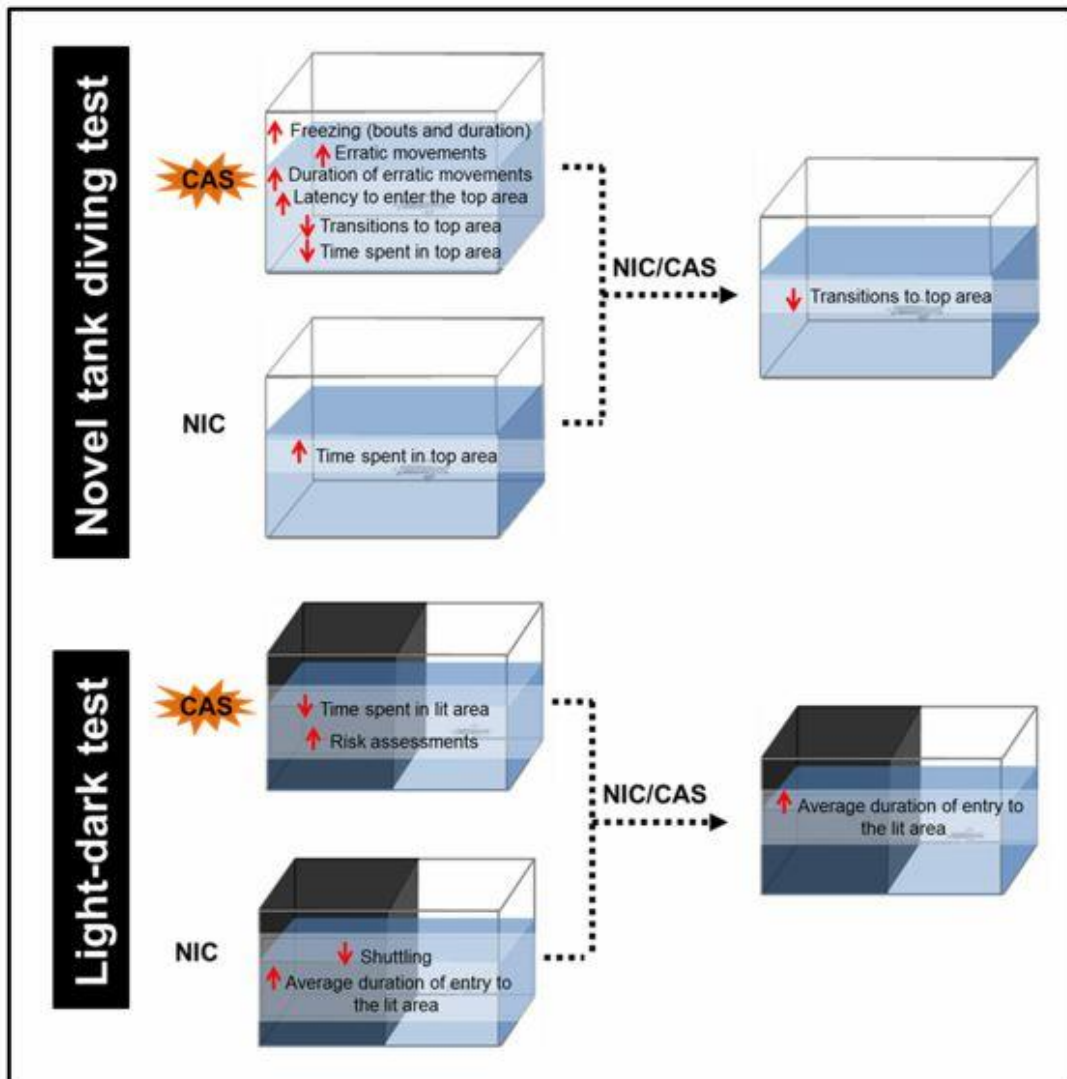
Denis B. Rosemberg

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria. 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. E-mail: dbrosemberg@gmail.com

Highlights

- We tested whether nicotine modulates anxiogenic-like behaviors in zebrafish.
- Behavioral parameters were measured in the novel tank and in the light-dark tests.
- Nicotine induces anxiolysis and prevents anxiogenic-like responses.
- Zebrafish is a suitable species to assess the relieving properties of nicotine.

Graphical abstract



Abstract

Anxiety-related disorders are severe psychiatric conditions that involve complex physiological and behavioral maladaptive responses. The use of conspecific alarm substance (CAS) for inducing anxiety-like behaviors in fish species provides important translational insights of how aversive conditions modulate neurobehavioral functions. Because nicotine may elicit anxiolytic-like responses, here we investigated whether acute nicotine exposure prevents CAS-induced anxiogenic-like behaviors in zebrafish. We used both novel tank and light-dark tests as two well-established paradigms for measuring anxiety-like behavior. Fish were individually exposed to 1 mg/L nicotine or non-chlorinated water for 3 min and then transferred to other tanks in the absence or presence of 3.5 mL/L CAS for 5 min. Later, the behavior of fish was tested in the novel tank test or in the light-dark preference test. As expected, CAS triggered aversive behaviors by increasing bottom dwelling, freezing, erratic movements, scototaxis, and risk assessment episodes. Nicotine alone elicited anxiolytic-like behaviors, since it increased the time spent in top area, as well as the average duration of entry in the lit compartment. Moreover, nicotine pretreatment prevented CAS-induced aversive responses without changing locomotion, suggesting that anxiolysis could play a role, at least in part, to the behavioral effects of nicotine observed here. Overall, these novel findings show beneficial effects of nicotine on anxiogenic responses in zebrafish. We also reinforce the practical advantages of this aquatic species to explore the relieving properties of nicotine, as well as to understand the neurobiological bases involved in anxiety-related disorders and associated therapeutic targets.

Keywords: anxiety-related disorders; conspecific alarm substance; nicotine; aversive behaviors; zebrafish.

1. Introduction

Anxiety-related disorders are one of the most prevalent psychiatric conditions worldwide, with multiple genetic and environmental determinants (Bartlett et al., 2017; Bishop, 2007). Psychological and physical symptoms include muscular tension, irritability, agitation, concentration problems, palpitations, dizziness, and epigastric discomfort (Peres et al., 2017; Shoham et al., 2018). Mounting evidence suggests that different neurotransmitter systems, including the cholinergic neurotransmission, modulate anxiety-like behaviors (File et al., 2000b; Zarrindast and Khakpai, 2015).

Nicotine influences a large number of physiological processes, such as learning and memory, locomotion, and anxiety (Jones et al., 1999; Zarrindast and Khakpai, 2018; Ziani et al., 2018). This molecule is an alkaloid extracted from the tobacco plant (Powledge, 2004) composed of pyridine and a pyrrolidine ring [1-methyl-2-(3-pyridyl) pyrrolidine], which binds to nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) (Lester et al., 2009). As an agonist of nAChRs, nicotine elicits various effects on the central nervous system (CNS) depending on site and receptor composition (Bencan and Levin, 2008; File et al., 2000a). A dualistic role of nicotine has been shown in experimental models, where it promotes anxiolysis or anxiogenic-like effects following acute and chronic exposure, respectively (Falco and Bevins, 2015; Singer et al., 2016; Stewart et al., 2015).

Although rodents have been widely used to assess the effects of nicotine on anxiety-related behaviors, there is a growing utility of zebrafish (*Danio rerio*) models in translational neuropsychiatric research (Fontana et al., 2018; Stewart et al., 2014). The advantages that make zebrafish an excellent tool include the efficient rate of absorption of substances through water (de Abreu et al., 2018), their evolutionarily conserved neurotransmitter systems when compared to the mammalian counterparts (Rico et al., 2011), their well-characterized behaviors (Kalueff et al., 2013), and the pharmacological sensitivity to anxiolytic and

anxiogenic drugs (Egan et al., 2009; Mezzomo et al., 2018; Rosemberg et al., 2012). Moreover, the presence of lateral pallium and habenula, analogous brain structures to mammalian hippocampus and amygdala, respectively, makes zebrafish a suitable model organism to investigate the neural bases of emotion and aversive responses (Champagne et al., 2010; Fontana et al., 2018).

In zebrafish, the conspecific alarm substance (CAS) exposure elicits anxiety-like behaviors (Canzian et al., 2017; Speedie and Gerlai, 2008). This substance is released when epidermal club cells are injured, reflecting a potential predator risk (Quadros et al., 2016). CAS triggers exacerbated defensive behaviors, as well as prolonged aversive responses (Lima et al., 2016; Maximino et al., 2018). Two well-established models for measuring anxiety-like behavior are the novel tank diving test (Egan et al., 2009; Levin et al., 2007) and the light-dark preference test (Maximino et al., 2010). While in the first task animals show a typical geotaxis and gradually habituate to novelty stress (Wong et al., 2010), in the light-dark test, zebrafish usually prefers the dark compartment of the apparatus, thereby facilitating crypsis (Maximino et al., 2010). Anxiolytic drugs increase the exploration of the lit area, whereas anxiogenic compounds exacerbate dark preference as a protective response (Mezzomo et al., 2016).

Although the anxiolytic properties of nicotine in zebrafish has been reported previously (Klee et al., 2011; Levin et al., 2007; Singer et al., 2016), to our knowledge, there are no data reporting a preventive role of nicotine against aversive responses. Thus, the goal of our study was to investigate whether a short-term nicotine exposure prevents CAS-induced anxiogenic-like behaviors in zebrafish using the novel tank and the light-dark preference tests.

2. Methods

2.1. Animals and housing

Subjects were adult zebrafish (*Danio rerio*, 3–4 months-old) from the short-fin phenotype (~50:50 male:female ratio) obtained from a local distributor (Hobby Aquários, RS, Brazil). Fish were kept in 40 L tanks at a maximum density of 2 fish per liter and acclimatized in the laboratory for two weeks before the experiments. Tanks were maintained under constant aeration and mechanical filtration and the water temperature was set at $27 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7.0–7.2. Room illumination was provided by fluorescent light tubes with photoperiod 14h light and 10h dark. Animals were fed thrice daily with commercial flake fish food (Alcon BASICTM, Alcon, Brazil). A total of 96 fish were used for the behavioural tests and 12 used for extraction of CAS. After the experiments, fish were anesthetized in water at 4°C and then euthanized by section of the spinal cord. Animals were maintained in accordance with the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. All experimental protocols were approved by the Ethics Commission on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (protocol number 6894010616).

2.2. Nicotine exposure

S(-)-Nicotine (98%) was purchased from Sigma-AldrichTM (St. Louis, MO, USA). Fish were exposed to 1 mg/L of nicotine added in tank water for 3 min as described elsewhere (Singer et al., 2016; Ziani et al., 2018). Later, animals were exposed to CAS and behavioral tests were performed. Control group was handled in a similar manner but kept in non-chlorinated water in the absence of nicotine.

2.3. *Conspecific alarm substance preparation*

Conspecific alarm substance was extracted from donor fish previously euthanized. Briefly, fish were placed in a Petri dish kept on ice and CAS were obtained through 10-15 superficial shallow cuts in epidermal cells with a razor blade (Egan et al., 2009; Lima et al., 2016; Quadros et al., 2016). Animals were then washed on both sides with 10 mL of distilled water per fish for preparing a CAS stock solution. The exposure was performed using 3.5 mL/L of CAS solution for 5 min, which elicits robust defensive responses in zebrafish (Canzian et al., 2017; Maximino et al., 2018; Speedie and Gerlai, 2008). For control group, only distilled water was added in the experimental tanks. **Figure 1** summarizes all experimental procedures, behavioral tests, and the groups assessed.

2.4. *Behavioral analyses*

All behaviors were recorded for 6 min using a webcam connected to a laptop at 30 frames/s with appropriate video-tracking software (Any-MazeTM, Stoelting, CO, USA).

2.4.1. *Novel tank diving test*

After the exposure period, fish were individually transferred to the novel tank apparatus (25 cm length x 15 cm height x 6 cm width), which was virtually divided in two segments (bottom area and top area) and filled with 2 L home tank water. Locomotor activity and vertical explorations were measured during habituation to novelty (Egan et al., 2009; Levin et al., 2007; Rosemberg et al., 2011) and the following endpoints were determined: distance traveled, absolute turn angle, maximum speed, transitions and time spent in top, latency to enter the top, number and duration of freezing, number and duration of erratic movements. Freezing was defined as a complete immobility of fish (≥ 2 s) with concomitant increased opercular beat rate, while erratic movements were defined as fast swimming bouts

with sudden changes in direction (Kalueff et al., 2013). Both freezing and erratic movements were manually counted by two trained observers (inter-rater reliability ≥ 0.85) blinded to the experimental condition of fish.

2.4.2. Light-dark test

Following nicotine and CAS exposure period, fish were individually transferred to the light-dark tank based on the protocol described elsewhere (Maximino et al., 2010). The apparatus (25 cm length \times 10 cm depth \times 15 cm height) was divided into two equally sized compartments by opaque self-adhesive plastic in white and black colors, covering the floor and walls. The respective behaviors were assessed: time spent in lit area, shuttling, average duration of entry in the lit area, and number of risk assessments. A risk assessment episode was defined as a fast (≤ 1 s) or partial entry into the lit area with a subsequent return to the dark compartment, which reflects a conflict between the motivation to explore and avoid unknown environments (Kalueff et al., 2013). Risk assessment episodes were manually counted by two trained observers (inter-rater reliability ≥ 0.85) blinded to the experimental condition.

2.5. Statistical analyses

Data were expressed as means \pm standard error of means (S.E.M.) and analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when necessary. The inter-rater reliability was estimated using Spearman correlation and all significances were set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Nicotine prevents CAS-induced aversive responses without changing locomotion

Figure 2 shows the behavioral effects of nicotine and CAS in the novel tank test. Independently of the treatment, no significant changes were observed in locomotor-related parameters (**Fig. 2A**). Regarding the vertical activity (**Fig. 2B**), although NIC/CAS group did not show significant changes in vertical drifts when compared to CAS-exposed fish, nicotine increased the time spent in top ($F_{(1,53)} = 25.57, p < 0.0001$ for nicotine term) and prevented CAS-induced effects on this behavior ($F_{(1,53)} = 16.83, p = 0.0001$ for the interaction term). Moreover, CAS increased the latency to enter the top ($F_{(1,53)} = 8.172, p = 0.0061$), when compared to control group. **Figure 3** shows the effects of nicotine and CAS on aversive behaviors. We observed a significant nicotine x CAS interaction for the number ($F_{(1,53)} = 5.189, p = 0.0268$) and duration of freezing ($F_{(1,53)} = 13.05, p = 0.0007$), as well as for the number ($F_{(1,53)} = 9.792, p = 0.0028$), and duration of erratic movements ($F_{(1,53)} = 8.394, p = 0.0055$). In general, CAS increased defensive behaviors and nicotine prevented these effects.

3.2. Nicotine prevents CAS-induced exacerbation on scototaxis

Figure 4 shows the behavioral effects of nicotine and CAS in the light-dark apparatus. CAS decreased the time spent in lit area, while nicotine showed a preventive effect ($F_{(1,36)} = 5.099, p = 0.0301$ for the interaction term). Nicotine-treated fish showed reduced shuttling ($F_{(1,36)} = 12.04, p = 0.0014$) and increased average duration of entry in the lit area in the absence and presence of CAS ($F_{(1,36)} = 15.37, p = 0.0004$). Nicotine also abolished the effects of CAS on the number of risk assessment episodes ($F_{(1,36)} = 8.655, p = 0.0056$).

4. Discussion

The current study examined the behavioral effects of nicotine pretreatment on CAS-induced aversive responses in zebrafish. Evidence shows that acute nicotine treatment in this aquatic species positively modulates cognitive responses and exerts anxiolytic-like responses in various behavioral tasks (Eddins et al., 2009; Levin et al., 2007; Singer et al., 2016; Ziani et al., 2018). Since CAS exacerbates defensive behaviors, it has been considered a chemical cue that elicits behavioral phenotypes that closely parallel those observed in patients with anxiety-, stress- and/or trauma-related disorders (Canzian et al., 2017; Lima et al., 2016; Maximino et al., 2018). To our knowledge, our data represent the first evidence showing that nicotine prevents anxiogenic-like behaviors in zebrafish, possibly due to its anxiolytic actions following an acute exposure.

In the last decade, zebrafish has emerged as an attractive model organism in psychiatry and translational neuroscience research to investigate the neural bases involved in anxiety-like responses (Fontana et al., 2018; Stewart et al., 2014). The novel tank and the light-dark tests are suitable protocols to evaluate defensive responses in zebrafish (Maximino et al., 2012). While in the novel tank diving test the motivational aspect is surface escaping (Blaser and Rosemberg, 2012), the main stimulus in the light-dark test is scototaxis (Maximino et al., 2012). Similar to previous findings, we observed that CAS-exposed fish exhibit typical behavioral patterns during habituation to novelty stress, such as increased erratic movements, freezing, and geotaxis (Quadros et al., 2016; Speedie and Gerlai, 2008). Zebrafish also showed robust scototaxis, as well as more risk assessment episodes in the light-dark test. These set of data reflect typical behavioral patterns associated with anxiety-like responses following acute CAS exposure. Importantly, nicotine-treated fish showed increased the average duration of entry in the lit area in the light-dark test and spent more time in top area in the novel tank diving test, suggesting anxiolysis. Moreover, nicotine

pretreatment abolished CAS-mediated responses, revealing a preventive effect on aversive behaviors. Because CAS and nicotine did not affect locomotion, the responses measured here reflect changes on anxiety-like behaviors instead of a simple modulation of motor patterns.

Various signaling molecules, such as biogenic amines, amino acids, peptides, and steroids play a role in anxiety, thereby modulating defensive behaviors (Benson et al., 2015; Strohle and Holsboer, 2003). In zebrafish, CAS acutely activates sympathetic nervous system and increases blood glucose, norepinephrine, and epinephrine, as well as serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid levels in the CNS, culminating in ‘fight or flight’ responses (Maximino et al., 2014; Quadros et al., 2018). Furthermore, an influence of cholinergic system in aversive responses of zebrafish is predicted, since CAS increases acetylcholinesterase activity in the brain (Canzian et al., 2017) and nicotine facilitates contextual fear conditioning following a single exposure to alarm cues (Ziani et al., 2018).

Anxiolytic compounds are commonly used to reduce the frequency of aversive behaviors. In humans, smoking is considered a key factor to minimize anxiety due to the relieving properties of nicotine (Fidler and West, 2009). Nicotine may promote anxiolysis or anxiogenesis depending on the species, concentration, administration route, and exposure period (Sackerman et al., 2010; Zarrindast and Khakpai, 2018). Acutely, the activation of nAChRs also facilitates the release of GABA (Maggi et al., 2001), which could play a role in anxiolytic effects of nicotine (Sullivan and Covey, 2002). Similar to mammals, zebrafish show high sensitivity to nicotine, which elicits consistent and robust anxiolytic-like responses following acute exposure (Levin et al., 2007; Sackerman et al., 2010; Singer et al., 2016). Importantly, the administration of methyllycaconitine and dihydro- β -erythroidine increases bottom dwelling in the presence of nicotine, implying a key role of both $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors in nicotine-mediated anxiolysis (Bencan and Levin, 2008). Since most neuronal nAChRs in the brain modulate the release of various neurotransmitters that

influence mood and anxiety (*e.g.*, acetylcholine, serotonin, glutamate, and dopamine) (Dani and Bertrand, 2007), the underlying mechanisms involved in the preventive role of nicotine against CAS-mediated responses still require further scrutiny.

5. Conclusion

To our knowledge, this is the first study showing a positive effect of nicotine on angiogenic responses in zebrafish, supporting the growing utility of this aquatic species to investigate the neurobehavioral effects of nicotine in vertebrates. Because distinct neurotransmitter systems regulate anxiety, thereby modulating defensive behaviors, the use of zebrafish is a promising tool to assess the molecular mechanisms underlying nicotine-mediated anxiolysis. Overall, paralleling clinical and rodent studies, our data support beneficial properties of nicotine in zebrafish, reinforcing practical advantages to explore the neurobiological bases involved in emotional impairments and their associated behaviors.

Acknowledgements

We recognize the financial support and fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). T.D, B.D.F, T.E.M, and K.T.B receive CAPES fellowship grants. J.C. receives the PROBIC/FAPERGS fellowship grant. D.B.R receives the CNPq research productivity grant (process number 307595/2015-3) and his work is also supported by PROEX/CAPES fellowship grant (process number 23038.005848/2018-31; grant number 0737/2018). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare that no competing interests exist.

References

- Bartlett, A.A., Singh, R., Hunter, R.G., 2017. Anxiety and Epigenetics. *Adv Exp Med Biol* 978, 145-166.
- Bencan, Z., Levin, E.D., 2008. The role of alpha7 and alpha4beta2 nicotinic receptors in the nicotine-induced anxiolytic effect in zebrafish. *Physiol Behav* 95(3), 408-412.
- Benson, C., Mifflin, K., Kerr, B., Jesudasan, S.J., Dursun, S., Baker, G., 2015. Biogenic Amines and the Amino Acids GABA and Glutamate: Relationships with Pain and Depression. *Mod Trends Pharmacopsychiatry* 30, 67-79.
- Bishop, S.J., 2007. Neurocognitive mechanisms of anxiety: an integrative account. *Trends Cogn Sci* 11(7), 307-316.
- Blaser, R.E., Rosemberg, D.B., 2012. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. *PLoS One* 7(5), e36931.
- Canzian, J., Fontana, B.D., Quadros, V.A., Rosemberg, D.B., 2017. Conspecific alarm substance differently alters group behavior of zebrafish populations: Putative involvement of cholinergic and purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses. *Behav Brain Res* 320, 255-263.
- Champagne, D.L., Hoefnagels, C.C., de Kloet, R.E., Richardson, M.K., 2010. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behav Brain Res* 214(2), 332-342.
- Dani, J.A., Bertrand, D., 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 699-729.
- de Abreu, M.S., Giacomini, A., Echevarria, D.J., Kalueff, A.V., 2018. Legal aspects of zebrafish neuropharmacology and neurotoxicology research. *Regul Toxicol Pharmacol* 101, 65-70.
- Eddins, D., Petro, A., Williams, P., Cerutti, D.T., Levin, E.D., 2009. Nicotine effects on learning in zebrafish: the role of dopaminergic systems. *Psychopharmacology (Berl)* 202(1-3), 103-109.
- 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. *Behav Brain Res* 205(1), 38-44.
- Falco, A.M., Bevins, R.A., 2015. Individual differences in the behavioral effects of nicotine: A review of the preclinical animal literature. *Pharmacol Biochem Behav* 138, 80-90.
- Fidler, J.A., West, R., 2009. Self-perceived smoking motives and their correlates in a general population sample. *Nicotine Tob Res* 11(10), 1182-1188.
- File, S.E., Cheeta, S., Kenny, P.J., 2000a. Neurobiological mechanisms by which nicotine mediates different types of anxiety. *Eur J Pharmacol* 393(1-3), 231-236.
- File, S.E., Kenny, P.J., Cheeta, S., 2000b. The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 66(1), 65-72.
- Fontana, B.D., Mezzomo, N.J., Kalueff, A.V., Rosemberg, D.B., 2018. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. *Exp Neurol* 299(Pt A), 157-171.
- Jones, S., Sudweeks, S., Yakel, J.L., 1999. Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci* 22(12), 555-561.

- Kalueff, A.V., Gebhardt, M., Stewart, A.M., Cachat, J.M., Brimmer, M., Chawla, J.S., Craddock, C., Kyzar, E.J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., Gilman, C.P., Pittman, J., Rosemberg, D.B., Gerlai, R., Echevarria, D., Lamb, E., Neuhaus, S.C., Weng, W., Bally-Cuif, L., Schneider, H., Zebrafish Neuroscience Research, C., 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish* 10(1), 70-86.
- Klee, E.W., Ebbert, J.O., Schneider, H., Hurt, R.D., Ekker, S.C., 2011. Zebrafish for the study of the biological effects of nicotine. *Nicotine Tob Res* 13(5), 301-312.
- Lester, H.A., Xiao, C., Srinivasan, R., Son, C.D., Miwa, J., Pantoja, R., Banghart, M.R., Dougherty, D.A., Goate, A.M., Wang, J.C., 2009. Nicotine is a selective pharmacological chaperone of acetylcholine receptor number and stoichiometry. Implications for drug discovery. *AAPS J* 11(1), 167-177.
- Levin, E.D., Bencan, Z., Cerutti, D.T., 2007. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav* 90(1), 54-58.
- Lima, M.G., Silva, R.X., Silva Sde, N., Rodrigues Ldo, S., Oliveira, K.R., Batista Ede, J., Maximino, C., Herculano, A.M., 2016. Time-dependent sensitization of stress responses in zebrafish: A putative model for post-traumatic stress disorder. *Behav Processes* 128, 70-82.
- Maggi, L., Sher, E., Cherubini, E., 2001. Regulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 536(Pt 1), 89-100.
- Maximino, C., Benzecry, R., Oliveira, K.R.M., Batista, E.D.O., Herculano, A.M., Rosemberg, D.B., de Oliveira, D.L., Blaser, R., 2012. A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. *Behaviour* 149(10-12), 1099-1123.
- Maximino, C., Lima, M.G., Costa, C.C., Guedes, I.M., Herculano, A.M., 2014. Fluoxetine and WAY 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822). *Pharmacol Biochem Behav* 124, 425-433.
- Maximino, C., Marques de Brito, T., Dias, C.A., Gouveia, A., Jr., Morato, S., 2010. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat Protoc* 5(2), 209-216.
- Maximino, C., Meinerz, D.L., Fontana, B.D., Mezzomo, N.J., Stefanello, F.V., de, S.P.A., Batista, C.B., Rubin, M.A., Barbosa, N.V., Rocha, J.B.T., Lima, M.G., Rosemberg, D.B., 2018. Extending the analysis of zebrafish behavioral endophenotypes for modeling psychiatric disorders: Fear conditioning to conspecific alarm response. *Behav Processes* 149, 35-42.
- Mezzomo, N.J., Fontana, B.D., Kalueff, A.V., Barcellos, L.J.G., Rosemberg, D.B., 2018. Understanding taurine CNS activity using alternative zebrafish models. *Neurosci Biobehav Rev* 90, 471-485.
- Mezzomo, N.J., Silveira, A., Giuliani, G.S., Quadros, V.A., Rosemberg, D.B., 2016. The role of taurine on anxiety-like behaviors in zebrafish: A comparative study using the novel tank and the light-dark tasks. *Neurosci Lett* 613, 19-24.
- Peres, M.F.P., Mercante, J.P.P., Tobo, P.R., Kamei, H., Bigal, M.E., 2017. Anxiety and depression symptoms and migraine: a symptom-based approach research. *J Headache Pain* 18(1), 37.
- Powledge, T.M., 2004. Nicotine as therapy. *PLoS Biol* 2(11), e404.
- Quadros, V.A., Costa, F.V., Canzian, J., Nogueira, C.W., Rosemberg, D.B., 2018. Modulatory role of conspecific alarm substance on aggression and brain monoamine oxidase activity in two zebrafish populations. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 86, 322-330.
- Quadros, V.A., Silveira, A., Giuliani, G.S., Didonet, F., Silveira, A.S., Nunes, M.E., Silva, T.O., Loro, V.L., Rosemberg, D.B., 2016. Strain- and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. *Behav Processes* 122, 1-11.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Seibt, K.J., Capiotti, K.M., Da Silva, R.S., Bonan, C.D., 2011. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol* 33(6), 608-617.
- Rosemberg, D.B., Braga, M.M., Rico, E.P., Loss, C.M., Cordova, S.D., Mussulini, B.H., Blaser, R.E., Leite, C.E., Campos, M.M., Dias, R.D., Calcagnotto, M.E., de Oliveira, D.L., Souza, D.O., 2012.

- Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. *Neuropharmacology* 63(4), 613-623.
- Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Mussulini, B.H., Piato, A.L., Calcagnotto, M.E., Bonan, C.D., Dias, R.D., Blaser, R.E., Souza, D.O., de Oliveira, D.L., 2011. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS One* 6(5), e19397.
- Sackerman, J., Donegan, J.J., Cunningham, C.S., Nguyen, N.N., Lawless, K., Long, A., Benno, R.H., Gould, G.G., 2010. Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of *Danio rerio* Line. *Int J Comp Psychol* 23(1), 43-61.
- Shoham, N., Lewis, G., Favarato, G., Cooper, C., 2018. Prevalence of anxiety disorders and symptoms in people with hearing impairment: a systematic review. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*.
- Singer, M.L., Oreschak, K., Rhinehart, Z., Robison, B.D., 2016. Anxiolytic effects of fluoxetine and nicotine exposure on exploratory behavior in zebrafish. *PeerJ* 4, e2352.
- Speedie, N., Gerlai, R., 2008. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 188(1), 168-177.
- Stewart, A.M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., Kalueff, A.V., 2014. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci* 37(5), 264-278.
- Stewart, A.M., Grossman, L., Collier, A.D., Echevarria, D.J., Kalueff, A.V., 2015. Anxiogenic-like effects of chronic nicotine exposure in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav* 139 Pt B, 112-120.
- Strohle, A., Holsboer, F., 2003. Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry* 36 Suppl 3, S207-214.
- Sullivan, M.A., Covey, L.S., 2002. Nicotine dependence: the role for antidepressants and anxiolytics. *Curr Opin Investig Drugs* 3(2), 262-271.
- Wong, K., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Roy, S., Goodspeed, J., Suci, C., Tan, J., Grimes, C., Chung, A., Rosenberg, M., Gaikwad, S., Denmark, A., Jackson, A., Kadri, F., Chung, K.M., Stewart, A., Gilder, T., Beeson, E., Zapolsky, I., Wu, N., Cachat, J., Kalueff, A.V., 2010. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 208(2), 450-457.
- Zarrindast, M.R., Khakpai, F., 2015. The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Arch Iran Med* 18(9), 591-603.
- Zarrindast, M.R., Khakpai, F., 2018. The modulatory role of nicotine on cognitive and non-cognitive functions. *Brain Res*.
- Ziani, P.R., Muller, T.E., Stefanello, F.V., Fontana, B.D., Duarte, T., Canzian, J., Rosemberg, D.B., 2018. Nicotine increases fear responses and brain acetylcholinesterase activity in a context-dependent manner in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav* 170, 36-43.

Figure Captions

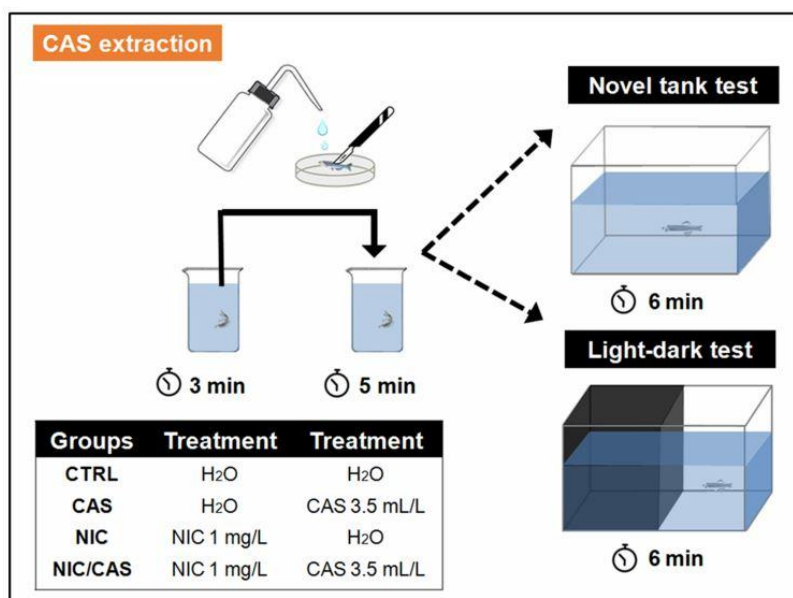


Fig. 1. Schematic representation of the experimental design and behavioral tests used for assessing the effects of nicotine on CAS-induced anxiogenic-like responses.

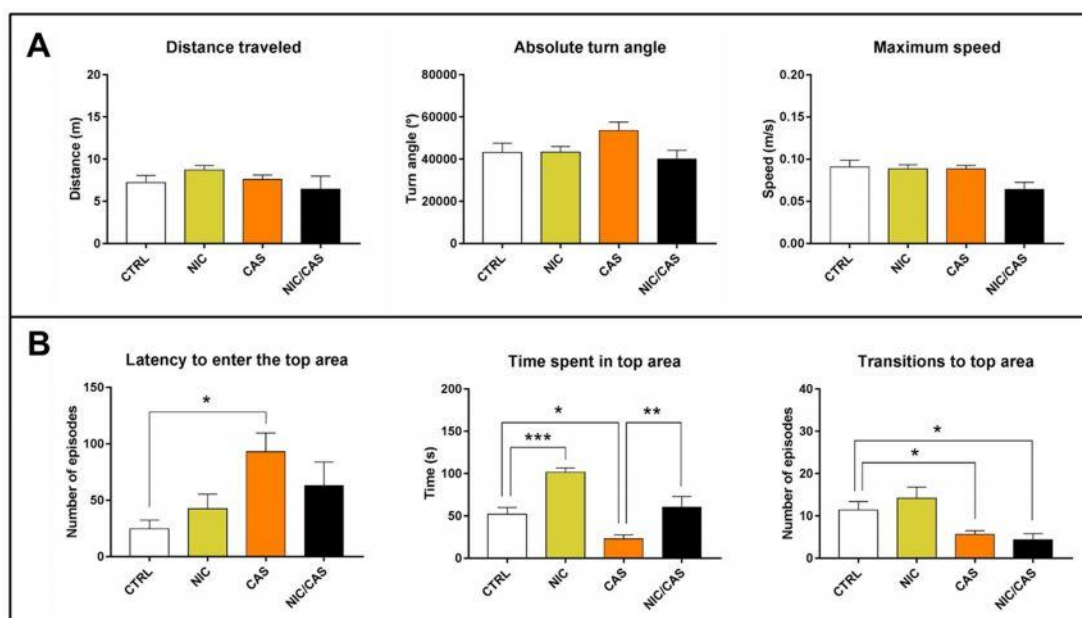


Fig. 2. Locomotor and exploratory activities of zebrafish in the novel tank test. **(A)** Locomotion-related behavioral endpoints. **(B)** Vertical exploration. Data were expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when necessary (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$, $n = 12$ per group).

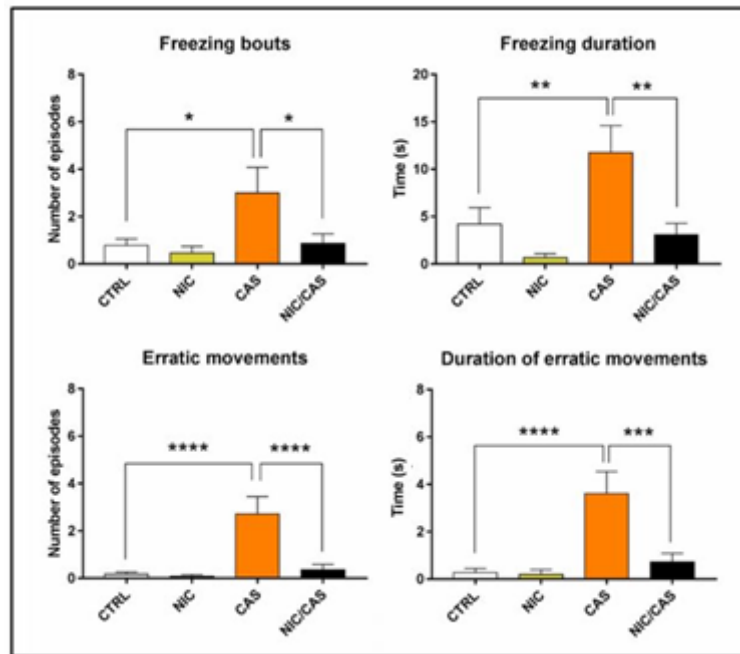


Fig. 3. Preventive effects of nicotine on CAS-induced aversive behaviors. Data were expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when necessary (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$, $n = 12$ per group).

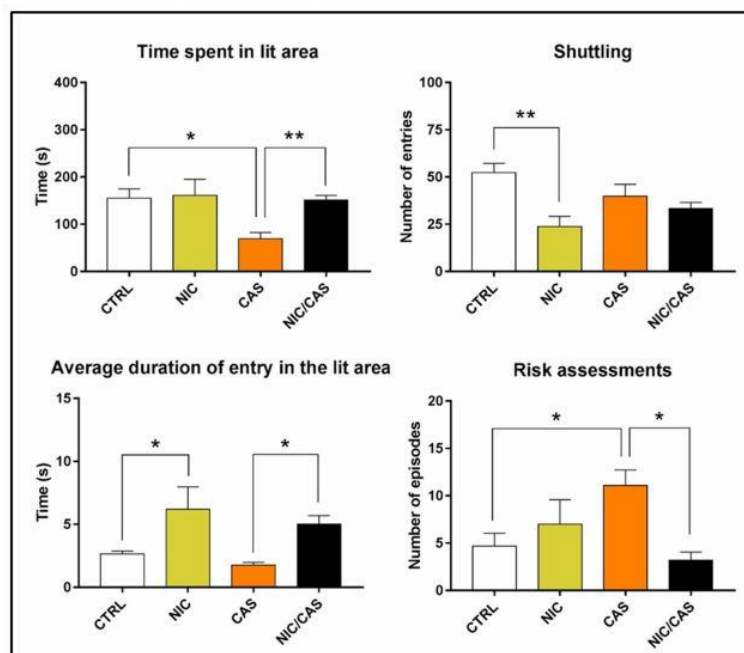


Fig. 4. Effects of nicotine and CAS on scototaxis. Data were expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when necessary (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, $n = 12$ per group).

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

- Peixes tratados com nicotina não tiveram mudanças nos parâmetros locomotores avaliados pelo teste do tanque novo (distância percorrida, ângulo de virada absoluto e velocidade máxima), mas apresentaram redução número de cruzamentos ao compartimento branco no teste claro-escuro.
- Apesar da SA não alterar parâmetros relacionados com a atividade locomotora, no teste do tanque novo aumentou a latência para entrar no topo quando comparado ao grupo controle e induziu respostas aversivas de congelamento e movimentos erráticos. Já no aparato claro-escuro, diminuiu o tempo gasto no compartimento branco e aumentou as avaliações de risco.
- Observamos uma interação significativa nicotina x SA para o número e duração do congelamento, bem como para o número e duração dos movimentos erráticos. Em relação à atividade vertical, a nicotina preveniu os efeitos induzidos pela SA sobre o tempo gasto no topo. Além disso, mostrou um efeito preventivo no tempo gasto no compartimento branco e também aboliu os efeitos da SA no número de episódios de avaliação de risco.
- Os testes do tanque novo e do aparato claro-escuro mostraram que a nicotina possui um efeito ansiolítico, enquanto que peixes expostos à SA apresentam comportamentos do tipo ansiogênico, os quais podem ser modulados pela exposição prévia à nicotina.

6. CONCLUSÃO FINAL

Os mecanismos pelos quais as influências genéticas e ambientais conferem vulnerabilidade à ansiedade são de extrema importância na pesquisa sobre ansiedade. De modo geral, este é o primeiro estudo mostrando um efeito positivo da nicotina sobre as respostas ansiogênicas em peixes-zebra. O uso desse organismo modelo é uma ferramenta promissora para avaliar os mecanismos moleculares subjacentes à ansiólise mediada pela nicotina. Além disso, em paralelo com estudos clínicos e de roedores, nossos dados apoiam as propriedades benéficas da nicotina, reforçando vantagens práticas para explorar as bases neurobiológicas envolvidas nesse distúrbio emocional e seus comportamentos correlatos.

7. PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Os transtornos de ansiedade são os distúrbios psiquiátricos mais prevalentes. A taxa de prevalência de transtornos de ansiedade em mulheres é aproximadamente duas vezes maior comparada aos homens (BANDELOW e MICHAELIS, 2015). Se essa estatística se replicar para o peixe-zebra com a análise dos efeitos em machos e fêmeas, tornará possível um melhor entendimento sobre a etiologia desse distúrbio. Estudos também são necessários para investigar se o estresse crônico e precoce contribui na formação de indivíduos adultos ansiosos. Em particular, será interessante determinar o impacto do estresse transgeracional sobre o comportamento de animais na fase larval e adulta. Indiscutivelmente, a questão mais importante diz respeito a como podemos usar os avanços científicos a fim de compreender os mecanismos neurocognitivos relacionados à ansiedade para se efetivar novas abordagens de tratamento e/ou prevenção.

REFERÊNCIAS

BANDELOW, B. e MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues Clin. Neurosci.** v. 17, p. 327–335, 2015.

BARROS, T. P. *et al.* Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. **British journal of pharmacology.** v. 154, n. 7, p. 1400-13, 2008.

BENOWITZ, N. L. Clinical Pharmacology of Nicotine. **Annual Review of Medicine.** v. 37, n. 1, p. 21–32, 1986.

BENOWITZ N. L., JACOB P. 3rd. Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. **Clin Pharmacol Ther.** v. 56, p. 483-56, 1994.

BERGEN, A. W. e CAPORASO, N. Cigarette smoking. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute.** v. 91, n. 16, p.1365–1375, 1999.

BISHOP, S. J. Neurocognitive mechanisms of anxiety: an integrative account. **Trends Cogn. Sci.** v. 11, n. 7, p. 307-316, 2007.

CACHAT, J. *et al.* Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nat. Prot.** n. 5, v. 11, p. 1786-1799, 2010.

CHIVERS, D. P. e SMITH, R. J. F. Chemical alarm signaling in aquatic predator-prey systems: a review and prospectus. **Ecoscience.** v. 5, p. 338-352, 1998.

CLAYTON, P. M. *et al.* Spectroscopic Studies on Nicotine and Normicotine in the UV Region. **Chirality.** v. 25, p. 288–293, 2013.

COLLIER, A. D. *et al.* Zebrafish and conditioned place preference: a translational model of drug reward. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 3, n. 55, p. 16-25, 2014.

DØVING, K. B. e LASTEIN, S. The Alarm Reaction in Fishes - Odorants, Modulations of Responses, Neural Pathways. **Annals of the New York Academy of Sciences.** v. 1170, p. 413–423, 2009.

EGAN, R. J. *et al.* Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behav. Brain Res.** n. 205, v. 1, p. 38-44, 2009.

FULCHER, N. *et al.* Neurochemical and Behavioral Responses to Unpredictable Chronic Mild Stress Following Developmental Isolation: The Zebrafish as a Model for Major Depression. **Zebrafish**. v. 14, n. 1, p. 23-34, 2017.

GALVÃO, J. F.; GALVÃO, T. F. e MOREAU, R. L. M. Tabaco. Em: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 4 Ed. **São Paulo: Atheneu Editora**. Cap. 4.8, p. 423-434, 2014.

GERLAI, R. Zebrafish antipredatory responses: A future for translational research? **Behav. Brain Res**. v. 207, p. 223–231, 2010.

GRAEFF, F. G. e HETEM, L. A. B. Transtornos da Ansiedade. **São Paulo: Atheneu Editora**. p. 434, 2004.

GUO, S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? **Genes Brain Behav**. v. 3, n. 2, p. 63–74, 2004.

HENNINGFIELD, J. E.; COHEN, C. e SLADE, J. D. Is nicotine more addictive than cocaine? **Br.J.Addict**. v. 86, p. 565-569, 1991.

HEVOK. Zebrafish. **Denigma**. Disponível em: <<http://denigma.de/gallery/383>>, 2012.

HINTZ, H. A. *et al.* Cultured fish epithelial cells are a source of alarm substance. **MethodsX**. v. 4, p. 480–485, 2017.

HOWE, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**. v. 25, n. 496, p. 498-503, 2013.

HUKKANEN, J.; JACOB, P. 3rd; BENOWITZ, N. L. Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. **Pharmacological Reviews**. v. 57, n. 1, p. 79–115, 2005.

JILOHA, R. C. Biological basis of tobacco addiction: Implications for smoking-cessation treatment. **Indian journal of psychiatry**. v. 52, n. 4, p. 301-7, 2010.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M. e GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends Pharmacol. Sci**. v. 35, p. 63–75, 2014.

KATAOKA, H.; INOUE, R.; YAGI, K. e SAITO, K. Determination of nicotine, cotinine and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmacology and Biomedical Analysis**. v. 49, n. 1, p. 108-114, 2008.

KERMEN, F., FRANCO, L. M., WYATT, C. e YAKSI, E. Neural Circuits Mediating Olfactory Driven Behavior in Fish. **Frontiers in Neural Circuits**. v. 7, n. 62, 2013.

KLEE, E. W. *et al.* Zebrafish for the Study of the Biological Effects of Nicotine. **Nicotine Tob Res.** v. 13, n. 5, p. 301–312, 2011.

KOZOL, R. A. *et al.* Function Over Form: Modeling Groups of Inherited Neurological Conditions in Zebrafish. **Front. Mol. Neurosci.** v. 9, p. 55, 2016.

LEVIN, E. D.; BENCAN, Z. e CERUTTI D. T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiology & Behavior.** n. 90, p. 54-58, 2007.

LILEY, N. R. Chemical Communication in Fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.** v. 39, p. 22–35, 1982.

LIMA, M. G. *et al.* Time-dependent sensitization of stress responses in zebrafish: A putative model for posttraumatic stress disorder. **Behav. Process.** v. 128, p.70–82, 2016.

MAGNO, L. D.; FONTES, A.; GONÇALVES, B. M. e GOUVEIA, A. JR. Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** v. 135, p. 169–176, 2015.

MAJDI, A.; KAMARI, F.; VAFAEE, M. S. e SADIGH-ETEGHAD, S. Revisiting nicotine's role in the ageing brain and cognitive impairment. **Rev. Neurosci.** v. 28, n. 7, p. 767-78, 2017.

MARTIN, E. I., RESSLER, K. J., BINDER, E., e NEMEROFF, C. B. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. **The Psychiatric clinics of North America.** v. 32, n. 3, p. 549-75, 2009.

MATHURU, A. S. *et al.* Chondroitin fragments are odorants that trigger fear behavior in fish. **Curr. Biol.** v. 22, p. 538–544, 2012.

MAXIMINO, C. *et al.* Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. **Behavioural Brain Research.** v. 214, p. 157–171, 2010.

MAXIMINO, C. *et al.* Extending the analysis of zebrafish behavioral endophenotypes for modeling psychiatric disorders: Fear conditioning to conspecific alarm response. **Behavioural Processes.** v. 149, p. 35-42, 2018a.

MAXIMINO, M. *et al.* Sensory ecology of *ostariophysan* alarm substances. **Journal of Fish Biology.** p. 1-46, 2018b.

MAY, R. O significado da ansiedade. **Rio de Janeiro: Zahar.** 1980.

MESULAM, M. M. *et al.* Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**. v. 110, p. 627- 639, 2002.

MOMBAERTS, P. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. **Nat Rev Neurosci**. v. 5, p. 263–278, 2004.

OKA, Y. e KORSCHING, S. I. Shared and Unique G Alpha Proteins in the Zebrafish versus Mammalian Senses of Taste and Smell. **Chemical Senses**. v. 36, p. 357–365, 2011.

PERRY, D. C.; DAVILA-GARCIA, M. I.; STOCKMEIER, C. A. e KELLAR, K. J. Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 289, p. 1545–1552, 1999.

PICCIOTTO, M. R. *et al.* Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. **Nature**. v. 391, p. 173–177, 1998.

QUADROS, V. A. *et al.* Strain- and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. **Behavioural Processes**. v. 122, p. 1–11, 2016.

RICO, E. P. *et al.* Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. **Neurotoxicol Teratol**. v. 33, n. 6, p. 608-17, 2011.

RUSSO, P.; NASTRUCCI, C.; ALZETTA, G. e SZALAI, C. Tobacco Habit: Historical, Cultural, Neurobiological, and Genetic Features of People's Relationship with an Addictive Drug. **Perspectives in Biology and Medicine**. v. 54, n. 4, p. 557-577, 2011.

SALAS, C.; BROGLIO, C.; DURAN, E.; GOMEZ, A.; OCANA, F. M.; JIMENEZ-MOYA, F. *et al.* Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. **Zebrafish**. v. 3, p. 151–157, 2006.

SCHAAF, M. J.; CHAMPAGNE, D.; VAN LAANEN, I. H.; VAN WIJK, D. C.; MEIJER, A. H.; MEIJER, O. C.; SPAINK, H. P. e RICHARDSON, M. K. Discovery of a functional glucocorticoid receptor beta-isoform in zebrafish. **Endocrinology**. v. 149, n. 4, p. 1591-9, 2008.

SCHILLING, T. F. The morphology of larval and adult zebrafish. **Oxford University Press**. p. 59-94, 2002.

SCHMIDEL A. J. *et al.* Subchronic atrazine exposure changes defensive behaviour profile and disrupts brain acetylcholinesterase activity of zebrafish. **Neurotoxicol. Teratol**. v. 44, p. 62–69, 2014.

SINGER, M. L.; ORESCHAK, K.; RHINEHART, Z. e ROBISON, B. D. Anxiolytic effects of fluoxetine and nicotine exposure on exploratory behavior in zebrafish. **PeerJ**. v. 4:e2352, 2016.

SOARES, M. C. CARDOSO, S. C.; CARVALHO, T. D. S. e MAXIMINO, C. Using model fish to study the biological mechanisms of cooperative behaviour: A future for translational research concerning social anxiety disorders? **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 82, p. 205–215, 2018.

STEWART, A. *et al.* Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. n. 35 v. 6, p. 1421-31, 2011a.

STEWART, A. *et al.* Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review. **Neuropharmacology**. v. 62 p. 135-143, 2011b.

SUBBIAH, S. e KAR, B. Adult zebrafish as a new animal model to study anxiety. **Asian J. Exp. Biol. Sci.** v. 4, n. 2, p. 167-171, 2013.

SUBRAMANIYAN, M. e DANI, J. A. Dopaminergic and cholinergic learning mechanisms in nicotine addiction. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1349, p. 46-63, 2015.

SUVEG, C.; MORELEN, D.; BREWER, G. A. e THOMASSIN, K. The emotion dysregulation model of anxiety: a preliminary path analytic examination. **J. Anxiety Disord.** v. 24, n. 8, p. 924-930, 2010.

SWAN, G. E. e LESSOV-SCHLAGGAR C. N. The Effects of Tobacco Smoke and Nicotine on Cognition and the Brain. **Neuropsychol Rev**. v. 17, p. 259–273, 2007.

WHITLOCK, K. E. The Sense of Scents: Olfactory Behaviors in the Zebrafish. **Zebrafish**. v. 3, p. 203–213, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Mental health in the workplace. Disponível em: <https://www.who.int/mental_health/in_the_workplace/en/>, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Report on Ageing and Health. WHO Press, Geneva, 2015.

ZIRGER, J. M.; BEATTIE, C. E.; MCKAY, D. B.; BOYD, R. T. Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **Gene Expr Patterns**. v. 3, p. 747-75, 2003.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da nicotina sobre alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela cetamina e por agentes estressores agudos em peixe zebra (*Danio rerio*)", protocolado sob o CEUA nº 6894010616, sob a responsabilidade de **Denis Broock Roseberg e equipe; Flávia Vestena Stefanello; Nicolli Lages; Paola Rampelotto Ziani; Stênio Ribeiro Zimmermann Nunes; Tâmie Duarte; Vanessa Andreatta de Quadros** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 23/06/2016.

We certify that the proposal "Effects of nicotine on behavioral and biochemical alterations promoted by ketamine and acute stressors in zebrafish (*Danio rerio*)", utilizing 272 Fishes (males and females), protocol number CEUA 6894010616, under the responsibility of **Denis Broock Roseberg and team; Flávia Vestena Stefanello; Nicolli Lages; Paola Rampelotto Ziani; Stênio Ribeiro Zimmermann Nunes; Tâmie Duarte; Vanessa Andreatta de Quadros** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 06/23/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2016** a **07/2019**

Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Procedência: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **4 a 6 meses**

N: **272**

Linhagem: **Danio rerio / wild type (WT/SF)**

Peso: **0250 a 0280 g**

Resumo: A nicotina é um alcaloide presente nas folhas do tabaco que possui diversos efeitos farmacológicos e toxicológicos. Estudos relatam o envolvimento da nicotina na melhora significativa das funções comportamentais de várias espécies, inclusive em humanos. Além da regulação da função motora, os receptores nicotínicos estão diretamente relacionados com efeitos sobre o aprendizado e memória. Ainda, a nicotina tem papel importante em modelos de ansiedade, devido ao seu efeito ansiolítico após um curto período de exposição. Em peixes, agentes estressores como a exposição aguda à substância de alarme e a perseguição com rede por um curto período podem gerar o fenótipo comportamental associado à medo e ansiedade, além de possibilitar a ativação do eixo do estresse e o aumento dos níveis de cortisol. Portanto, é relevante investigar os efeitos que a nicotina pode exercer sobre o prejuízo da função locomotora (surgimento de comportamentos estereotipados) e déficit cognitivo causados por doses sub-aneestésicas de cetamina em nível de sistema nervoso central (SNC). Além disso, devido ao seu potencial papel ansiolítico, a nicotina poderia exercer efeitos benéficos em modelos relacionados a indução de estresse químico e físico. Dessa forma, o objetivo geral do presente projeto é elucidar os efeitos neurocomportamentais da nicotina sobre as alterações promovidas pela cetamina e agentes estressores agudos em peixe zebra (*Danio rerio*).

Local do experimento: Laboratório de Fisiologia de Peixes (LAFIPE), UFSM, CCS - Departamento de Farmacologia e Fisiologia.

Santa Maria, 04 de julho de 2016

Prof. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Roseberg
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO CIENTÍFICO

Denise Rosemberg | My Journals | Log Out | Help **EVISE**

PROGRESS IN
Neuro-Pharmacology & Biological Psychiatry

Home Reports

My Reviewer Tasks My Author Tasks

[Start New Submission](#) Click here to view your submissions with a final decision

My Submissions with Journal (2)

Nicotine prevents anxiety-like behavioral responses in zebrafish
Current status: With Editor (09/Jan/2019)

PNP_2019_23
Editor-in-Chief: Louis Genotron
Article Type: Research Paper
Initial submission : 09/Jan/2019

ANEXO C – LISTA DOS TRABALHOS COLABORATIVOS DESENVOLVIDOS DURANTE O MESTRADO

1. Ziani PR, Müller TE, Stefanello FV, Fontana BD, **Duarte T**, Canzian J, Rosemberg DB. Nicotine increases fear responses and brain acetylcholinesterase activity in a context-dependent manner in zebrafish. **Pharmacol Biochem Behav.** 2018 Jul;170:36-43. doi: 10.1016/j.pbb.2018.05.004.
2. Julia Canzian, Barbara D. Fontana, Vanessa A. Quadros, Talise E. Müller, **Tâmie Duarte**, Denis B. Rosemberg. Single pentylenetetrazole exposure increases aggression in adult zebrafish at different time intervals. **Neuroscience Letters.** Volume 692, 23 January 2019, Pages 27-32. doi: 10.1016/j.neulet.2018.10.045.
3. Nathana J. Mezzomo, Talise Muller, Leonardo Barcellos, **Tâmie Duarte**, Vania Loro, Gessi Koakoski, Vanessa A. Quadros, Aline Pompermaier, Barbara Fontana, Denis Rosemberg, Suelen M. Soares, Julia Canzian. Taurine modulates the stress response in zebrafish. **Hormones and Behavior.** Volume 109, March 2019, Pages 44-52. doi: 10.1016/j.yhbeh.2019.02.006.
4. Barbara Fontana, **Tamie Duarte**; Talise Müller; Julia Canzian; Paola Ziani; Nathana Mezzomo; Matthew Parker; Denis Rosemberg. Concomitant taurine exposure counteracts ethanol-induced changes in locomotor and anxiety-like responses in zebrafish. **European Journal of Pharmacology.** Submission no: EJP-49879.