

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

**Paola Rampelotto Ziani**

**NICOTINA MODULA A RESPOSTA DE MEDO CONDICIONADO**  
**CONTEXTUAL EM PEIXE-ZEBRA**

Santa Maria, RS

2018

**Paola Rampelotto Ziani**

**NICOTINA MODULA A RESPOSTA DE MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL  
EM PEIXE-ZEBRA**

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

Orientador: Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg

Santa Maria, RS

2018

Ziani, Paola Rampelotto

Nicotina modula a resposta de medo condicionado contextual em peixe-zebra / Paola Rampelotto Ziani.- 2018.

49 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, 2018

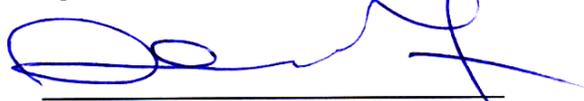
1. Memória aversiva 2. Nicotina 3. Substância de alarme 4. Peixe-zebra 5. Sistema colinérgico I. Rosemberg, Denis Broock II. Título.

**Paola Rampelotto Ziani**

**NICOTINA MODULA A RESPOSTA DE MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL  
EM PEIXE-ZEBRA**

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

**Aprovado em 26 de fevereiro de 2018:**



**Denis Broock Rosemberg, Dr. (UFSM)**

Presidente/Orientador



**Maribel Antonello Rubin, Dra. (UFSM)**



**Eduardo Pacheco Rico, Dr. (UNESC)**

Santa Maria, RS

2018

## **AGRADECIMENTOS**

- Agradeço aos meus pais, Veronete e Gilmar, que sempre tiveram paciência e confiança, apesar de todas as dificuldades. Vocês são os motivos pelos quais busco ser uma pessoa melhor a cada dia!
- Agradeço ao meu melhor amigo e companheiro, Stênio, por todo amor e compreensão. É com seu incentivo que faço meus sonhos se tornarem realidade.
- Agradeço ao meu orientador, Denis, pelas oportunidade de crescimento profissional e aprendizado durante essa etapa.
- Agradeço aos meus colegas de laboratório pelo apoio. Agradeço especialmente aos amigos que levarei para a vida Talise, Tâmie, Barbara e Kanandra, foi com a amizade e as experiências ao lado de vocês que consegui superar as adversidades.
- A todos que de alguma forma fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado!
- Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro e à UFSM.

## RESUMO

### NICOTINA MODULA A RESPOSTA DE MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL EM PEIXE-ZEBRA

AUTOR: Paola Rampelotto Ziani

ORIENTADOR: Denis Broock Rosemberg

As condições aversivas em um determinado contexto geram aprendizagem associativa, a qual permite aos organismos aprender e antecipar eventos potencialmente nocivos. A exposição à substância de alarme de co-específicos (CAS) tem sido usada para modelar respostas de medo em peixe-zebra e sabe-se que o sistema colinérgico desempenha um papel chave em funções cognitivas. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a nicotina modula respostas de medo condicionado contextual em peixe-zebra, bem como um possível envolvimento da acetilcolinesterase (AChE) cerebral nessas respostas. Os peixes foram expostos a 1 mg/L de nicotina e posteriormente transferidos para aquários de teste na ausência ou presença de 3,5 mL/L de CAS por 5 minutos (sessão de treino). A CAS foi extraída por raspagens de células epiteliais em 10 mL de água destilada utilizando peixes doadores previamente eutanasiados. Após 24 horas, os peixes foram expostos ao mesmo contexto ou a um contexto alterado na ausência de CAS (sessão pós-treino). No treino, CAS aumentou o congelamento, os movimentos erráticos e diminuiu o tempo gasto na área superior do tanque, enquanto a nicotina aboliu os efeitos da CAS sobre os movimentos erráticos. No entanto, o grupo nicotina/CAS apresentou uma exacerbação do congelamento e uma redução significativa do número de entradas na área superior quando reintroduzido ao contexto aversivo. Observamos também uma diminuição na distância percorrida nos grupos controle, nicotina e nicotina/CAS na sessão pós-treino. Uma vez que o tempo gasto na área superior não diferiu em animais reanalisados em contextos semelhante e alterado, esta medida poderia refletir a sensibilização induzida pela exposição à CAS. Ademais, a atividade da AChE cerebral aumentou no grupo nicotina/CAS reintroduzido ao contexto aversivo. Nossos dados mostram uma modulação positiva da nicotina sobre o medo condicionado contextual em peixe zebra, bem como um envolvimento da sinalização colinérgica em respostas aversivas relacionadas ao contexto.

**Palavras-chave:** Memória aversiva; nicotina; substância de alarme; peixe-zebra; sistema colinérgico.

## ABSTRACT

### NICOTINE MODULATES CONTEXTUAL FEAR CONDITIONING RESPONSES IN ZEBRAFISH

AUTHOR: Paola Rampelotto Ziani

ADVISOR: Denis Broock Rosemberg

Aversive conditions in a certain context trigger associative learning processes, which allow organisms to learn and anticipate potentially dangerous events. Exposure to conspecific alarm substance (CAS) has been used for modeling fear responses in zebrafish and the cholinergic system plays a role in cognitive functions. Thus, the goal of this study was to evaluate whether nicotine modulates contextual fear conditioning responses in zebrafish and a putative involvement of brain acetylcholinesterase (AChE) in associative learning. Fish were exposed to 1 mg/L nicotine and further transferred to experimental tanks in the absence or presence of 3.5 mL/L CAS for 5 min (training session). CAS was extracted by damaging epithelial cells into 10 mL distilled water using donor fish euthanized previously. After 24 hours, fish were placed to the same or to an altered context in the absence of CAS (post-training session). At training session, CAS increased freezing, erratic movements, and decreased the time spent in top area, while nicotine pretreatment abolished CAS effects on erratic movements. Nonetheless, nicotine/CAS group reintroduced to aversive context showed exacerbated freezing and reduced the number of entries in top area. Moreover, a decrease in distance traveled was observed in control, nicotine and nicotine/CAS groups at post-training session. Since the time spent in top area did not differ in animals retested in similar and altered contexts, this behavioral endpoint could reflect CAS-induced sensitization. Additionally, brain AChE activity increased in nicotine/CAS group reintroduced to the aversive context. Collectively, we demonstrate for the first time a positive modulation of nicotine on contextual fear conditioning in zebrafish and a putative involvement of cholinergic signaling in aversive responses.

**Keywords:** Aversive memory; nicotine; conspecific alarm substance; zebrafish, cholinergic system.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AChE – Acetilcolinesterase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAS – Substância de alarme de co-específicos (do inglês *consppecific alarm substance*)

Dpf – Dias pós-fertilização

HPA – Eixo-hipotálamo-pituitária-adrenal

HPI – Eixo-hipotálamo-pituitária-inter-renal

RNAn – Receptores nicotínicos de acetilcolina neuronais

SNC – Sistema nervoso central

WHO – Organização mundial da saúde (do inglês, *World Health Organization*)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação do teste de medo condicionado contextual em roedores.....	12
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática do desenvolvimento do peixe-zebra em dias após a fertilização (dpf) até a fase adulta.....	14
<b>Figura 3:</b> Representação dos principais comportamentos defensivos do peixe-zebra.....	16
<b>Figura 4:</b> Fórmula estrutural da nicotina.....	16
<b>Figura 5:</b> Hidrólise da acetilcolina na fenda sináptica.....	18

## SUMÁRIO

<b>1. APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
2.1. Medo e ansiedade em transtornos neuropsiquiátricos.....	11
2.2. Modelos animais de medo condicionado contextual.....	11
2.3. O peixe-zebra como organismo modelo na neurociência translacional.....	13
2.4. Nicotina e efeitos neurocomportamentais em modelos experimentais.....	16
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
<b>4. MANUSCRITO CIENTÍFICO.....</b>	<b>20</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6. PERSPECTIVAS DO ESTUDO.....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA/UFSM.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO.....</b>	<b>49</b>

## 1. APRESENTAÇÃO

Esta Dissertação aborda assuntos relacionados aos efeitos da nicotina sobre respostas de medo contextual condicionado em peixe-zebra, a qual encontra-se estruturada da seguinte maneira:

- **INTRODUÇÃO:** Revisão da literatura sobre os temas abordados na dissertação.
- **MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Apresentados na forma de artigo científico.
- **CONCLUSÃO:** Interpretações gerais sobre os resultados obtidos nesse trabalho.
- **PERSPECTIVAS:** Possibilidades de novos estudos a partir de resultados obtidos.
- **REFERÊNCIAS:** Lista de citações que aparecem na introdução da Dissertação.

## **2. INTRODUÇÃO**

### **2.1. Medo e ansiedade em transtornos neuropsiquiátricos**

Ao enfrentar situações de eventual perigo, os organismos tendem a apresentar uma série de reações físicas e psicológicas, onde o conjunto dessas respostas pode ser denominado como medo. Essa emoção reflete uma perturbação aflitiva frente a um risco real, que pode ser definido através de um série de respostas corporais adaptativas (McEWEN, 1998; RUHL et al., 2017). Além de ameaças iminentes, o medo também pode se manifestar através da associação a fatos já vivenciados, a qual é capaz de promover desde uma breve ansiedade até um estado de pânico. Contudo, a sensação de perigo é de suma importância para sobrevivência das espécies, pois prepara o organismo para duas prováveis ações naturais: a luta ou a fuga (JESUTHASAN, 2012; ROOZENDAAL et al., 2009).

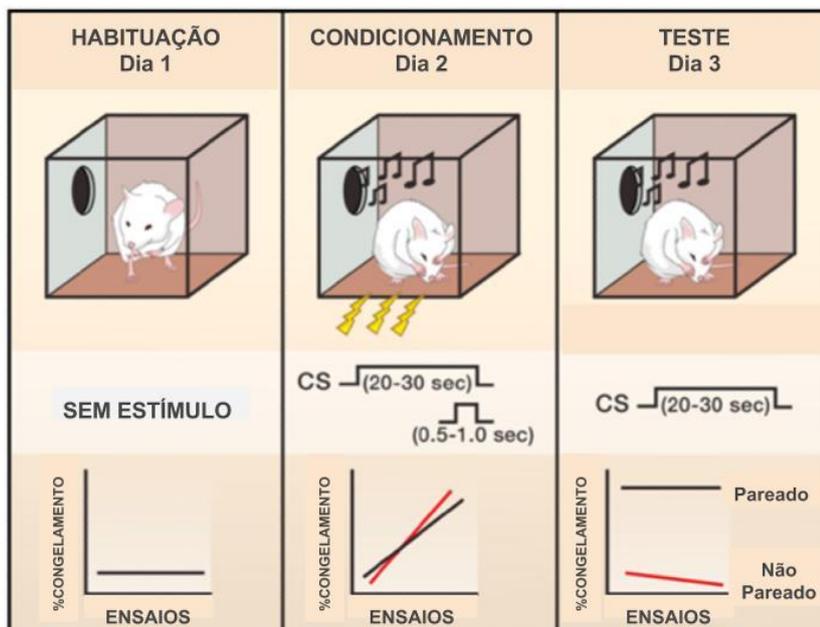
Enquanto o medo é caracterizado por uma experiência desagradável, a ansiedade é definida como a antecipação dessa ameaça. No entanto, quando esse comportamento é exacerbado, leva o indivíduo a um estado patológico (JESUTHASAN, 2012). Sabe-se que os transtornos de ansiedade são as disfunções neuropsiquiátricas de maior ocorrência no mundo, os quais além de causarem medo excessivo, podem conduzir a doenças mais graves como a depressão (JESUTHASAN, 2012; KYSIL et al., 2017; LANDGRAF e WIGGER, 2002). De 1990 até 2013, a média da população que desenvolveu algum tipo de transtorno de ansiedade ou depressão chegou a 50%, passando de 416 milhões para 615 milhões. Isso revela que aproximadamente 10% da população mundial é afetada (WHO). Só nos Estados Unidos, a média de gastos em tratamento de transtornos neuropsiquiátricos chega a US\$ 42,3 bilhões (KUTLU e GOULD, 2015). Desse modo, estudos sobre distúrbios psiquiátricos têm ganhado grande espaço na ciência ao redor do mundo.

### **2.2. Modelos animais de medo condicionado contextual**

Assim como os seres humanos, os animais também apresentam respostas relacionadas ao medo e à ansiedade, as quais refletem uma série de adaptações fisiológicas e neurocomportamentais (GRAY, 1987; LIMA et al., 2016; QUADROS et al., 2016). Essas reações são amplamente estudadas através de diferentes modelos experimentais, tais como memória aversiva (BAGATINI et al., 2016), esquiva condicionada (XU et al., 2007), medo condicionado contextual (KENNEY et al., 2017), entre outros.

Diversos modelos animais relacionam processos de aprendizagem associativa a um determinado contexto utilizando estímulos aversivos. O paradigma do medo condicionado contextual é usualmente utilizado para estudos de aprendizagem e memória (SHIN, 2012), no qual os animais exibem respostas defensivas através da associação do contexto com o estímulo nocivo. Nesse modelo, um estímulo neutro é pareado com um estímulo aversivo, o qual vai resultar em comportamento de medo no animal. Depois que houver o pareamento, uma resposta de medo vai ser desencadeada pelo estímulo neutro. Assim, os estímulos neutros passam a provocar respostas aversivas em decorrência da antecipação de uma ameaça. Desse modo, o modelo de medo condicionado contextual provoca a recuperação de memórias traumáticas. As respostas são medidas através da frequência de episódios de congelamento (KUTLU e GOULD, 2015; RUHL et al., 2017) e estudos com roedores destacam a eficácia deste modelo experimental (JOHANSEN et al., 2011). A **Figura 1** exemplifica como acontece a assimilação de um estímulo aversivo a um estímulo condicionado neutro, tal como o som.

**Figura 1:** Representação do teste de medo condicionado contextual em roedores.



**Fonte:** Adaptado de JOHANSEN et al., 2011.

As tarefas de medo condicionado também podem ser utilizadas em estudos relacionados à sensibilização de eventos. A sensibilização dependente de tempo é um fenômeno no qual os animais expostos a um agente estressor intenso manifestam respostas de medo intensificadas após um determinado período (LIMA et al., 2016). Sendo assim, um

animal que foi exposto a um agente nocivo pode ter comportamentos relacionados ao medo e à ansiedade exacerbados após certo tempo. Este modelo é de grande relevância para estudos que mimetizam fenótipos comportamentais associados ao estresse pós traumático (CARAMILLO et al., 2015). Além disso, pode-se utilizar tarefas que induzam a sensibilização dependente de tempo para investigar possíveis fármacos que modulem a memória por meio de estímulo aversivo (POULOS et al., 2016).

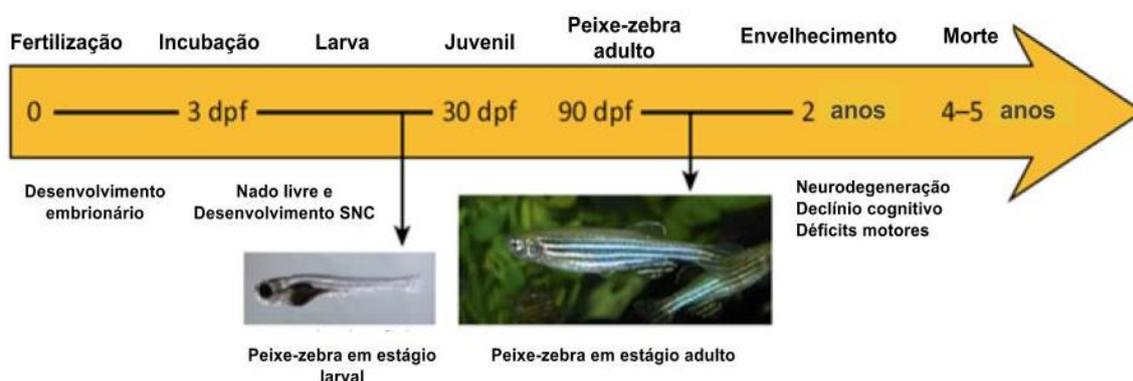
Embora as pesquisas relacionadas com medo e ansiedade em roedores já seja bastante difundida, tais organismos apresentam um elevado custo de obtenção e manutenção. Desse modo, a avaliação de mecanismos neuroquímicos e comportamentais envolvidos em respostas aversivas em modelos animais alternativos, é de grande importância para validar estratégias de pesquisa complementar ao uso dos ratos e camundongos (JESUTHASAN 2012; LEUNG e MOURRAIN, 2016).

### **2.3. O peixe-zebra como organismo modelo na neurociência translacional**

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um teleosteo tropical da família Cyprinidae que mede aproximadamente 3–4 centímetros. Popularmente conhecido como paulistinha, o peixe-zebra é um importante organismo modelo em diferentes áreas do conhecimento, tais como bioquímica, farmacologia, genética, ecologia, neurociências e biologia do comportamento (CANZIAN et al., 2017; FONTANA et al., 2018; HO et al., 2018; PANNEERSELVAN e RAGUNATHANET 2018). Dentre as vantagens gerais para uso deste organismo modelo podemos destacar o baixo custo, o pequeno espaço para manutenção, a alta taxa de reprodução, o rápido desenvolvimento de embrião até a fase adulta (cerca de 3 meses) e a presença de ovos translúcidos com desenvolvimento externo, o que permite melhor acompanhamento de mudanças morfológicas ao longo da ontogenia (**Figura 2**).

Devido ao genoma completamente sequenciado e pelo fato deste apresentar um alto grau de similaridade com o genoma de mamíferos, o peixe-zebra é de grande valia para o estudo de doenças humanas (HOWE et al., 2013). Com a inovação na síntese e descoberta da ação de fármacos ainda se faz necessário o uso de testes biológicos. Assim, a utilização do peixe-zebra apresenta muitas particularidades que atendem aos critérios de redução, substituição e refinamento nas pesquisas científicas. Ademais, seu importante papel em estudos de triagem se dá por reduzir tanto o número de animais de maior porte (roedores), como a quantidade dos compostos a serem testados e os resíduos produzidos (ROSEMBERG et al., 2011).

**Figura 2:** Representação esquemática do desenvolvimento do peixe-zebra em dias após a fertilização (dpf) até a fase adulta.



**Fonte:** Adaptado de STEWART et al., 2014.

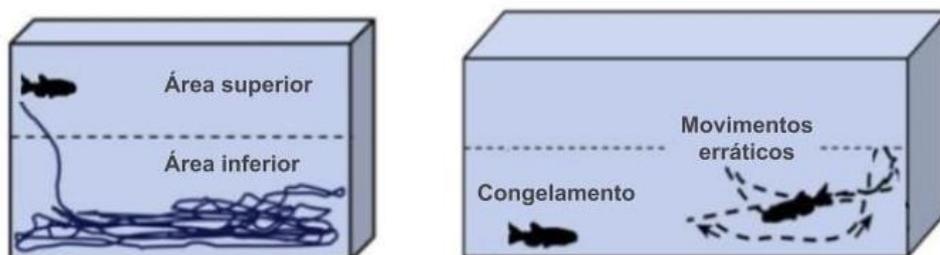
Considerando que o peixe-zebra apresenta um amplo repertório comportamental já catalogado na literatura (KALUEFF et al., 2013), a espécie apresenta o potencial para relevantes descobertas sobre os endofenótipos neurocomportamentais associados a patologias em geral, tais como doenças neurodegenerativas (CARAMILLO e ECHEVARRIA 2017; MULLER et al., 2017) e transtornos neuropsiquiátricos (FONTANA et al., 2018; FULCHER et al., 2017). Todos esses aspectos levaram a um crescimento exponencial do número de publicações que usam o peixe-zebra como organismo modelo em pesquisas científicas (STEWART et al., 2014). Complementarmente, a espécie oferece uma ótima oportunidade para explorar diferentes fenótipos comportamentais relacionados à exposição de diversos compostos que modulam o sistema nervoso central (SNC), tais como cafeína (ROSA et al., 2017), taurina (FONTANA et al., 2016; MEZZOMO et al., 2017), etanol (RICO et al., 2017), nicotina (STEWART et al., 2015), entre outros.

A indução de medo em peixe-zebra pode ser realizada de várias formas. De acordo com Gray (1987), podem haver cinco categorias de estímulos aversivos. Eles são classificados como estímulo predatório (AHMED et al., 2011), novidade (ROSEMBERG et al., 2011), choque elétrico (XU et al., 2007), estímulo intenso (BLASER et al., 2010) e substâncias químicas (EGAN et al., 2009). Um estímulo amplamente utilizado na indução do medo em peixe-zebra é a substância de alarme de co-específicos (CAS). Descrita pela primeira vez em 1938 como “*Schreckstoff*”, é uma substância produzida e liberada por células

epiteliais de peixes quando ocorre lesão na pele desses animais (SMITH, 1992). A liberação da CAS no ambiente tem como principal objetivo a proteção do cardume, onde o animal ferido alerta os demais sobre a presença de um predador. Os co-específicos detectam a substância através de quimiorreceptores sensíveis, resultando na ação natural de luta ou fuga. Apesar de ser uma mistura complexa, sabe-se que a 3-N-óxido de hipoxantina e o sulfato de condroitina são duas moléculas que podem induzir as respostas aversivas da CAS (SPEEDIE e GERLAI, 2008).

Em peixe-zebra, o medo pode ser detectado pela mudança do nado habitual dos peixes, os quais inicialmente se mantêm no fundo do tanque, e posteriormente exploram o topo quando se habitua à novidade (EGAN et al., 2009; ROSEMBERG et al., 2011). Quando expostos à CAS, os peixes permanecem um maior tempo no fundo do aquário, aumentam a frequência de movimentos erráticos e de congelamento, além de apresentarem uma maior coesão do cardume (MAXIMINO et al., 2010; MOURABIT et al., 2010; SPEEDIE e GERLAI, 2008). Além disso, a exposição aguda à CAS é capaz de promover uma sensibilização dependente de tempo em peixe-zebra, constituindo um modelo experimental para estudo de experiências traumáticas (KUTLU e GOULD 2015; LIMA et al., 2016). A exposição aguda a agentes estressores também pode levar à ativação de diversos sistemas hormonais e à liberação de diferentes neurotransmissores. Nesse contexto, existem regiões cerebrais envolvidas com a percepção de estímulos por substâncias químicas que facilitam tanto o reconhecimento social quanto a detecção de predadores (MAXIMINO et al., 2013). Em mamíferos, a amígdala é responsável por controlar emoções e comportamento aversivo, e lesões nessa área levam à incapacidade de reconhecer a sensação de medo, mesmo em situações de ameaça (PERATHONER et al., 2016). Além da amígdala, outra região do SNC que processa informações emocionais e sensoriais é o hipotálamo. Esta glândula é responsável por regular o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em mamíferos na resposta ao estresse, que é análoga ao eixo-hipotálamo-pituitária-inter-renal (HPI) em peixes (KUTLU e GOULD 2015). Resumidamente, a amígdala e o hipocampo regulam a resposta ao estresse de forma coordenada. Estudos relatam que a exposição aguda à CAS em peixe-zebra aumenta a expressão do gene *c-fos* habenular, a qual é uma estrutura de função similar à amígdala em mamíferos, levando o animal a comportamentos defensivos que podem ser diretamente associados ao medo (OGAWA et al., 2014). Os principais fenótipos aversivos observados em peixe-zebra encontram-se representados na **Figura 3**.

**Figura 3:** Representação dos principais comportamentos defensivos do peixe-zebra.

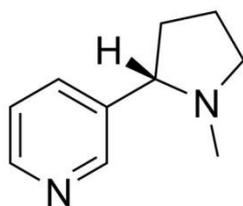


**Fonte:** Adaptado de STEWART et al., 2014.

#### 2.4. Nicotina e efeitos neurocomportamentais em modelos experimentais

Com relação a moléculas que apresentam um papel na modulação do medo, ansiedade, aprendizagem e respostas aversivas, estudos têm demonstrado os efeitos pleiotrópicos da nicotina em animais de experimentação (BARIK e WONNACOTT 2009; BEER et al., 2013; KLEE et al., 2011). Essa molécula é um alcalóide proveniente das folhas do tabaco (*Nicotiana tabacum*) e exerce vários efeitos sobre o SNC, além de ser o principal responsável pelo tabagismo. De fórmula molecular  $C_{10}H_{14}N_2$  (**Figura 4**), se apresenta em temperatura ambiente na forma líquida de cor amarela e ganhou este nome devido ao difusor do tabaco na França, Jean Nicot (BARIK e WONNACOTT 2009; SABOGA-NUNES et al., 2017). A Agência de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA) permite a produção de cigarros contendo nicotina, no entanto adverte sobre os riscos da utilização. Embora seja bastante considerada por seus efeitos maléficos à saúde, a nicotina tem sido muito estudada nos últimos anos principalmente devido à sua ação farmacológica sobre os receptores colinérgicos nicotínicos no SNC (IJOMONE e NWOHA 2015).

**Figura 4:** Fórmula estrutural da nicotina.



**Fonte:** Do autor.

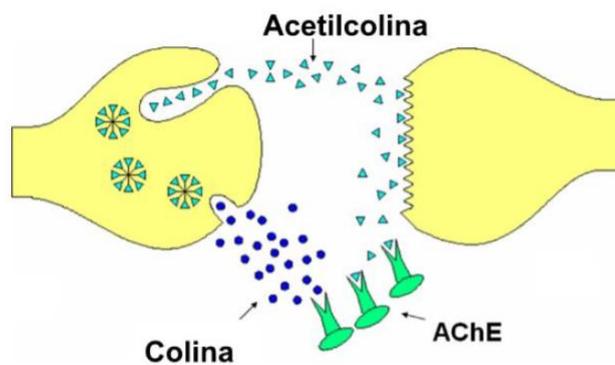
A nicotina é capaz de diminuir a ansiedade e medo quando administrada em breve exposição. Por exemplo, em peixe-zebra, já foi mostrado que a exposição aguda à nicotina diminui significativamente o tempo de nado no fundo do aquário, sugerindo um caráter ansiolítico (KLEE et al., 2011; LEVIN et al., 2007). Além das propriedades ansiolíticas, a nicotina promove a melhora das funções cognitivas (BEER et al., 2013; LEVIN et al., 2006; MAY et al., 2016). Agonistas nicotínicos tem sido utilizados para desenvolver novos tratamentos de doenças neurológicas, como por exemplo a Doença de Alzheimer. Estudos mostram que peixe-zebra testados no paradigma de discriminação espacial apresentam uma melhora na aprendizagem quando expostos à nicotina. Interessantemente, esse efeito foi proeminente 20, 30 e 40 minutos após uma breve exposição à substância, corroborando com a ideia de que é necessário um determinado período de tempo para a nicotina atingir seu efeito máximo (LEVIN et al., 2006).

Outros estudos têm mostrado que a nicotina modula a aquisição, consolidação e evocação de memórias de medo através da sua ação sobre receptores nicotínicos (KUTLU e GOULD 2015). Os receptores nicotínicos de acetilcolina neuronais (RNAn) são membros da superfamília de canais iônicos ativados por ligante, os quais medeiam rápidas transmissões sinápticas no SNC. Tais receptores desempenham um importante papel no aprendizado, memória e atenção, através da ligação com o neurotransmissor acetilcolina ou agonistas exógenos como a nicotina (BARIK e WONNACOTT 2009; BRAIDA et al., 2014; HOGG et al., 2003). Os efeitos mediados pelos RNAn podem ser distintos de acordo com sua localização. Em neurônios pré-sinápticos, provoca a liberação de neurotransmissores enquanto que em neurônios pós-sinápticos contribuem para despolarização e ativação do sistema de mensageiros secundários (BROIDE e LESLIE, 1999; WONNACOTT, 1997). De acordo com a literatura, a ativação do sistema de mensageiros secundários e a subsequente cascata de sinalização celular pode estar diretamente envolvida com processos de formação de memória a longo prazo (KUTLU e GOULD 2015). É importante ressaltar que os padrões de expressão espacial e temporal dos RNAn são similares em peixe-zebra e humanos, evidenciando assim funções evolutivamente conservadas (KLEE et al., 2011).

A nicotina é capaz de ativar RNAn, provocando a liberação de diversos neurotransmissores, tal como a acetilcolina (KUTLU e GOULD 2016; TANI et al., 1998). Levando em consideração que o aumento dos níveis de acetilcolina cerebrais são primordiais para as funções cognitivas (CHANGEUX et al., 2015; LENDVAI et al., 2013), a atividade da acetilcolinesterase (AChE) deve ser rigorosamente regulada. A AChE cerebral é uma importante enzima responsável pela hidrólise e inativação da acetilcolina na fenda sináptica,

como representado na **Figura 5** (SOREQ e SEIDMAN 2001). Considerando que um aumento significativo na atividade da AChE cerebral de peixe-zebra foi observada imediatamente após uma única exposição à CAS, o que sugere o envolvimento do metabolismo da acetilcolina com respostas aversivas na espécie (CANZIAN et al., 2017), a determinação da atividade desta enzima é de suma importância para elucidar possíveis mecanismos neuroquímicos relacionados aos modelos de medo nessa espécie.

**Figura 5:** Hidrólise da acetilcolina na fenda sináptica.



**Fonte:** Do autor.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar os efeitos da nicotina sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em um modelo de medo condicionado contextual em peixe-zebra.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos da nicotina sobre os comportamentos defensivos de congelamento e de movimentos erráticos em peixes-zebra submetidos ao teste de medo condicionado contextual;
- Analisar a exploração vertical e a atividade locomotora de peixes-zebra expostos a nicotina submetidos ao teste de medo condicionado contextual;
- Verificar se a nicotina é capaz de modular a atividade da AChE cerebral em peixes-zebra reintroduzidos ao contexto aversivo.

#### 4. MANUSCRITO

*Nicotine modulates contextual fear conditioning responses in zebrafish: putative involvement of brain acetylcholinesterase in associative learning*

Paola R. Ziani<sup>a,b,\*</sup>, Talise E. Müller<sup>a,b</sup>, Flavia V. Stefanello<sup>a</sup>, Barbara D. Fontana<sup>a,b</sup>, Tâmie Duarte<sup>a,b</sup>, Julia Canzian<sup>a</sup> and Denis B. Rosemberg<sup>a,b,d,\*</sup>

*O manuscrito apresenta-se na forma ao qual foi submetido ao periódico  
Psychopharmacology.*

# Nicotine modulates contextual fear conditioning responses in zebrafish: putative involvement of brain acetylcholinesterase in associative learning

Paola R. Ziani<sup>a,b,\*</sup>, Talise E. Müller<sup>a,b</sup>, Flavia V. Stefanello<sup>a</sup>, Barbara D. Fontana<sup>a,b</sup>, Tâmie Duarte<sup>a,b</sup>, Julia Canzian<sup>a</sup> and Denis B. Rosemberg<sup>a,b,d,\*</sup>

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

<sup>b</sup> *Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria. 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS, 97105–900, Brazil.*

<sup>c</sup> *The International Zebrafish Neuroscience Research Consortium (ZNRC), 309 Palmer Court, Slidell, LA 70458, USA.*

\* Correspondence to:

**Denis B. Rosemberg**

E-mail: [dbrosemberg@gmail.com](mailto:dbrosemberg@gmail.com)

**Paola R. Ziani**

E-mail: [paolarziani@gmail.com](mailto:paolarziani@gmail.com)

**Conflict of interest:** The authors declare that no competing interests exist.

**Acknowledgments:** We recognize financial support and fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). P.R.Z., T.E.M., B.D.F., T.D. are recipients of fellowship from CAPES. J.C. is recipient of fellowship from FAPERGS (PROBIC/FAPERGS). F.V.S. is recipient of fellowship from CNPq (PIBIC/CNPq). D.B.R. is recipient of CNPq research productivity grant (307595/2015-3). All authors contributed to preparation of the manuscript and approved the final version. The funders had no influence on the data collection, analyses and manuscript submission. The authors also thank Dr. Maria Ester Pereira for the valuable contribution to the statistical analyses support.

## **Abstract**

**Rationale:** Nicotine positively modulates learning and memory processes, including contextual fear conditioning, in which fear triggers associative learning processes. Exposure to conspecific alarm substance (CAS) has been used for modeling fear-like behaviors in zebrafish, but the involvement of cholinergic system on associative learning in this species is poorly understood. **Objectives:** We evaluate whether nicotine modulates contextual fear conditioning responses in zebrafish and a putative involvement of brain acetylcholinesterase (AChE) in associative learning. **Methods:** Fish were exposed to 1 mg/L nicotine and further transferred to experimental tanks in the absence or presence of 3.5 mL/L CAS for 5 min (training session). After 24 hours, fish were placed to the same or to an altered context in the absence of CAS (post-training session). After behavioral experiments, brain AChE activity was assessed. **Results:** At training, CAS increased freezing, erratic movements, and decreased the time spent in top area, while nicotine pretreatment abolished CAS effects on erratic movements. Nonetheless, nicotine/CAS group reintroduced to aversive context showed exacerbated freezing and reduced the number of entries in top area. Moreover, a decrease in distance traveled was observed in control, nicotine and nicotine/CAS groups at post-training. Since the time spent in top did not differ in animals retested in similar and altered contexts, this measure could reflect CAS-induced sensitization. Nicotine also stimulated brain AChE activity in CAS-exposed animals reintroduced to the aversive context. **Conclusions:** We demonstrate a positive modulation of nicotine on contextual fear conditioning in zebrafish and suggest an involvement of cholinergic signaling in associative learning.

**Keywords:** Contextual fear conditioning; associative learning; nicotine; conspecific alarm substance; zebrafish; cholinergic signaling.

## **Introduction**

Nicotine is an alkaloid present in tobacco leaves, which play several effects in the central nervous system (CNS) (Levin et al. 2006; Levin and Rezvani 2000). Studies have shown potential anxiolytic properties of nicotine after a short-term exposure (Klee et al. 2011; Levin et al. 2006; Singer et al. 2016). This molecule has agonistic effects in nicotinic acetylcholine receptors (Barik and Wonnacott 2009) and modulates the release of dopamine and serotonin, contributing to its physiological effects in the brain (File et al. 2000). Moreover, previous data showed a decrease in the number of acetylcholinesterase (AChE) positive cells in the hippocampus and striatum of rats following chronic nicotine administration (Ijomone and Nwoha 2015). Previous data showed that nicotine improves cognitive functions in experimental models (Braida et al. 2014; Levin et al. 2006) and the activation of nicotinic acetylcholine receptors in the brain plays a key role in acquisition memory and contextual fear conditioning responses in rodents (Davis and Gould 2006; Kutlu and Gould 2015). Consequently, nicotine modulates synaptic process improving learning and memory performance (Subramaniyan and Dani 2015).

Fear is an adaptive response that occurs when animals face stressful and dangerous situations (McEwen 1998; Ruhl et al. 2017). Aversive conditions trigger associative learning processes allowing organisms to learn and anticipate potentially dangerous events (Rooszendaal et al. 2009). In a classical fear conditioning protocol, animals learn to exhibit defensive responses to a neutral conditioned stimulus (CS) after association with a noxious unconditioned stimulus (US). The contextual fear conditioning is a behavioral paradigm that pairs an aversive stimulus with specific cues, which later may retrieve aversive memories when animals are reintroduced to the same context in the absence of US (Kutlu and Gould 2015). Thus, the assessment of associative learning processes contribute to explore the behavioral neurophenotypes and the neural mechanisms underlying aversive learning and

memory (Johansen et al. 2011). In a translational perspective, understanding the biological processes associated with aversive behaviors is of great interest. Exacerbated fear responses may promote distress increasing the risk of fear-, anxiety-, and trauma-related disorders (Dahlin et al. 2005; Shin and Liberzon 2010; Singewald et al. 2015). Thus, alternative experimental models are emergent tools in behavioral neuroscience to assess associative learning in a medium-to high-throughput manner.

Zebrafish (*Danio rerio*) is a promising model organism in neuropsychopharmacology and behavioral neuroscience (Gerlai et al. 2000; Maximino et al. 2010). This species provides excellent translational responses and presents a high degree of physiological and genetic conservation (Fontana et al. 2016; Howe et al. 2013). In fish, conspecific alarm substance (CAS) is a chemical cue released from injured epidermal club cells (Lima et al. 2016; Oliveira et al. 2014; Rehnberg et al. 1987). Acute CAS exposure up-regulates habenular *c-fos* expression and triggers defensive behaviors in zebrafish (e.g., freezing, erratic movements, bottom dwelling, and improves shoal cohesion), indicating increased fear-like behaviors (Canzian et al. 2017; Ogawa et al. 2014; Quadros et al. 2016). Moreover, a brief CAS exposure produces immediate defensive responses, which is sustained for at least 24 hours, suggesting sensitization of aversive behaviors (Lima et al. 2016). Thereby, CAS consists in an excellent naturalistic stimulus that induces fear. Hence, the zebrafish offer a great opportunity to explore how different pharmacological manipulations modulate contextual fear conditioning. Since aversive memories may be evoked after a traumatic event and considering the nicotine involvement on learning processes, the goal of this study was to investigate the role of nicotine on contextual fear memory in zebrafish. Moreover, we investigate a putative involvement of brain AChE activity in associative learning after reintroducing animals to the aversive context.

## Materials and methods

### *Animals*

Subjects were 80 adult (4-6 months-old) of mixed genders (~50:50 male and female) short-fin wild-type zebrafish (*Danio rerio*) obtained from a commercial supplier (Hobby Aquarios, RS, Brazil). The animals were kept in 50-L tanks under constant filtration and aeration for two weeks before the experiments. Tanks were filled with non-chlorinated water at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  and pH 7.2. Room illumination was provided by ceiling-mounted fluorescent light tubes on a 14:10 light/dark photoperiod cycle (lights on at 7:00 am). All fish were fed twice daily with commercial flake fish food (Alcon BASIC™, Alcon, Brazil). To minimize the effects of isolation stress, animals were previously habituated into housing tanks measuring 50 cm × 35 cm × 6 cm (length × width × height), which had equal divisions for each fish (6 cm × 6 cm × 6 cm – length × width × height) and small perforations (0.5 cm diameter). These perforated Plexiglas partitions were designed to allow free water circulation inside the tank. Since animals were separated by transparent partitions, fish were able to visualize conspecifics, allowing a precise identification of each subject throughout the experimentation. Animals were maintained in accordance with the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. All protocols were approved by the Ethics Commission on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (process number 6894010616).

### *Nicotine treatment*

S(-)-Nicotine solution (98%) was purchased from Sigma-Aldrich™ (St. Louis, MO). Fish were exposed to 1 mg/L nicotine or non-chlorinated water (control) immediately before the training session into 500-mL beakers for 3 minutes. Nicotine concentration and time of exposure were chosen based in a previous report (Singer et al. 2016). After nicotine

treatment, fish were transferred to other beakers containing non-chlorinated water for 20 minutes, a time in which nicotine reaches the maximum effect in zebrafish (Levin et al. 2006). Later, the behavioral experiments were performed.

#### *Conspecific alarm substance preparation*

CAS was extracted from zebrafish epidermal cells as described previously (Canzian et al. 2017; Egan et al. 2009; Lima et al. 2016; Quadros et al. 2016). Donor fish were rapidly euthanized by decapitation and the blood excess was further dried with a swab. Fish were placed in a Petri dish kept on ice and 10–15 superficial shallow cuts were made on both sides of the fish body with a razor blade. All procedures were carefully controlled to avoid drawing blood, which would contaminate the solution. Later, 10 mL of distilled water was added in a Petri dish and gently shaken to fully cover lacerated portions of the fish body. The exposure was performed using 3.5 mL/L of the skin extract (Canzian et al. 2017; Lima et al. 2016).

#### *Contextual fear conditioning*

Training and contextual fear assessments were performed in identical experimental tanks (15 cm length × 13 cm height × 10 cm width), located in a well-lit room over a stable surface. Visual cues were defined by externally covering the lateral walls and floor with opaque plastic self-adhesive films in black- and white-colored stripes (spaced 2 cm apart) (**Fig. 1A**). Additionally, other tanks with the same dimensions without these visual cues were used to verify the influence of altered context on fish behavior. Tanks were virtually divided into bottom and top areas to assess vertical exploration.

Behavioral activities were recorded in both training and post-training sessions as illustrated (**Fig. 1B**). Each zebrafish was subjected to a single fear conditioning training session. In brief, fish were treated with non-chlorinated water or 1mg/L nicotine and further

placed in the apparatuses (with or without visual cues) in the absence (control group) or presence of 3.5 mL/L CAS as US for 5 min. CAS exposure protocol was chosen based in previous studies, which showed increased fear-like responses of zebrafish (Canzian et al. 2017; Lima et al. 2016; Quadros et al. 2016). Afterwards, each fish was gently netted from the experimental apparatuses and transferred to the partitioned housing tanks.

On the following day (post-training session), fish were placed in the experimental tanks (with visual cues) to assess the post-training session in the absence of CAS. **Fig. 1C** shows the experimental design used to investigate the influence of contextual fear conditioning using different tanks. Video recordings were assessed with automated video-tracking software (ANY-maze<sup>TM</sup>, Stoelting CO, USA). Aversive behaviors (freezing and erratic movements) were manually scored by two trained observers (inter-rater reliability > 0.85) blind to the experimental condition. Freezing was defined by the cessation of movements, except gills or eyes, for at least 2 s. Erratic movements consist of abrupt changes in swimming direction associated with fast swimming bouts (Kalueff et al. 2013). Locomotor activity was assessed by the distance traveled, while vertical exploration was measured by quantifying the time spent in top and the number of entries in the upper segment.

#### *Determination of brain AChE activity*

After behavioral analyses, animals were immediately euthanized to remove brain tissue. To prepare each independent sample, two brains were pooled and homogenized in 1 mL of Tris–citrate buffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 7.4). AChE activity was measured by quantifying thiolate dianion formation at 412 nm using 5,5'-dithionitro-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) as color reagent (Ellman et al. 1961). In a final volume of 300  $\mu$ L, 5  $\mu$ g protein of brain sample were added and preincubated at 25°C for 10 min in a reaction medium containing 33  $\mu$ L of 100 mM phosphate buffer, pH 7.5 and 2.0 mM DTNB. AChE

activity was measured by determining the acetylthiocholine iodide (0.88 mM) hydrolysis rate for 3 min (intervals of 30 s) in a microplate reader (Canzian et al. 2017; Rosemberg et al. 2010). AChE activity was expressed as  $\mu\text{mol thiocholine (SCh)}/\text{h}/\text{mg protein}$ . Protein content per sample was quantified by the Coomassie Brilliant Blue G reagent (Bradford 1976) using bovine serum albumin as standard.

### *Statistical analysis*

Data normality and homoscedasticity were assessed by Kolmogorov-Smirnov and Bartlett's tests, respectively. All results were expressed as means  $\pm$  standard error of means (S.E.M.). Behavioral data were analyzed by repeated measures ANOVA, while biochemical results were assessed by two-way ANOVA. Post hoc analyses were performed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate. The significance level was set at  $p \leq 0.05$ .

## **Results**

### *Aversive responses*

**Fig. 2A** shows the effects of nicotine and CAS on freezing when a similar context was used at post-training session. Repeated measures ANOVA revealed significant treatment x session interactions ( $F_{(3,53)} = 3.749$ ,  $p = 0.0162$  and  $F_{(3,53)} = 8.444$ ,  $p = 0.0001$ , for freezing bouts and freezing duration, respectively), in which CAS significantly increased freezing bouts at both sessions. Nicotine-treated fish previously exposed to CAS showed a robust increase in freezing bouts and spent more time frozen when reintroduced to the aversive context. Repeated measures ANOVA yielded significant effects of treatment ( $F_{(3,47)} = 5.018$ ,  $p = 0.0042$ ), in which CAS elicits freezing at training session, but no significant changes were observed when fish were tested in the altered context (**Fig. 2B**). Moreover, CAS significantly

increased the number ( $F_{(3,53)} = 8.849, p < 0.0001$ , for the interaction term) and duration ( $F_{(3,53)} = 9.195, p < 0.0001$ , for the interaction term) of erratic movements and nicotine prevented these effects. No significant differences among groups were observed at post-training session following CAS exposure in different visual contexts (**Fig. 3**).

#### *Vertical swimming*

**Fig. 4** shows the vertical activity of zebrafish at training and post-training sessions. Regarding the transitions to top area, statistical analyses revealed significant effects of treatment ( $F_{(3,53)} = 4.635, p = 0.0060$ ) and session ( $F_{(1,53)} = 14.61, p = 0.0003$ ). Post hoc analyses showed less vertical activity in nicotine-treated group at post-training session when reintroduced to the aversive context (**Fig. 4A**), but not in the altered context (**Fig. 4B**). In both situations, a significant effect of treatment was observed ( $F_{(3,53)} = 12.8, p < 0.0001$ ), in which CAS-exposed zebrafish spent less time in top area in the absence or presence of nicotine at training and post-training sessions.

#### *Locomotor activity*

**Fig. 5** depicts the effects of nicotine and CAS on locomotor parameters of zebrafish. When zebrafish were reintroduced to the aversive context (**Fig. 5A**), repeated measures ANOVA for distance traveled yielded significant effects of treatment ( $F_{(3,53)} = 5.433, p < 0.0001$ ) and session ( $F_{(1,53)} = 26.48, p < 0.0001$ ). A significant lower distance traveled was observed in control, nicotine, and nicotine/CAS groups at post-training session, while no changes were observed when zebrafish were tested in the altered context.

#### *Brain AChE activity*

**Fig. 6** shows the effects of nicotine and CAS on brain AChE activity. Statistical analyses indicate significant effects of CAS ( $F_{(1,24)} = 5.425, p = 0.0286$ ) and nicotine ( $F_{(1,24)} = 4.338, p = 0.0481$ ) when zebrafish were reintroduced to the aversive context. Post hoc tests revealed a significant increase in AChE activity in nicotine-treated group previously exposed to CAS (**Fig. 6A**), but no significant changes were observed in animals further tested in the altered context (**Fig. 6B**).

## Discussion

In this report, we investigate whether nicotine treatment before the training session alters contextual fear conditioning responses of zebrafish. Studies demonstrate that CAS induces fear (Canzian et al. 2017; Ogawa et al. 2014; Quadros et al. 2016) and a time-dependent sensitization in zebrafish 24 h after a single exposure, indicating persistent effects on defensive behaviors (Lima et al. 2016). Aversive memories may be activated when animals are reintroduced to the context in which they previously experience fear or stress, culminating in behavioral changes (Lima et al. 2016; Ruhl et al. 2017; Stewart et al. 2014). Our data revealed that CAS triggered aversive behaviors by increasing freezing and erratic movements at training session. However, exacerbated freezing was observed 24 h later in the presence of aversive context without CAS. Since nicotine treatment did not elicit similar responses when animals were later tested in the altered context, our novel findings suggest a modulatory effect of nicotine on aversive memory of zebrafish. Moreover, considering the increased AChE activity in nicotine/CAS group reintroduced to the aversive context, we suggest a putative involvement of cholinergic system in contextual fear conditioning responses of zebrafish.

In the literature, the association of different behavioral endpoints reflects defensive responses of zebrafish. Aversive situations may increase freezing, erratic movements,

avoidance, and geotaxis (Jesuthasan 2012; Speedie and Gerlai 2008). Usually, bottom dwelling is a protective response during novelty stress that decreases when animals habituate to the environment (Egan et al. 2009; Wong et al. 2010). CAS-exposed fish spent less time in top area at both training and post-training sessions and nicotine did not alter this effect. Since CAS elicits similar responses in animals tested in different contexts at post-training session, changes in time spent in upper segments could reflect nonassociative effects of CAS, such as sensitization of defensive responses (Lima et al. 2016). When nicotine-treated zebrafish were reintroduced to the aversive context, transitions to upper segment were decreased when compared with untreated group and freezing responses were exacerbated. Thus, we hypothesize that the increased freezing behaviors could influence swimming activity in nicotine/CAS group. Furthermore, the lower distance traveled in control and nicotine groups retested in similar tanks could reflect habituation, since we did not observe this response in animals further exposed to the altered context.

Contextual fear conditioning represents a basic protocol for measuring associative learning in several species (Kim and Jung 2006). While freezing is the most consistent endpoint of fear in rats and mice, zebrafish may freeze and swim erratically in the bottom of the tank (Kalueff et al. 2013). As expected, CAS increased freezing and erratic movements at training session, while freezing responses were exacerbated in nicotine-pretreated animals reintroduced to the aversive context 24 h after CAS exposure. Despite the aversive behaviors of zebrafish have not been elucidated properly so far, our data are consistent with the literature. For example, rodents previously placed in a novel arena in the presence of US and a visual cue as CS tend to demonstrate increased freezing responses if they associate that environment with the aversive stimulus after return to the context (Goosens and Maren 2001; Signor et al. 2014). Although more studies are needed to clarify how nicotine influences zebrafish neurobehavioral phenotypes, this molecule abolished the effects of CAS on erratic

movements at training session, suggesting a modulatory role on aversive behavior when the alarm cue is present.

Since different effects nicotine were observed in CAS group at training and post-training sessions, a putative role of the cholinergic system may be postulated. Indeed, studies clearly demonstrate that nicotine induces long-term potentiation by activating nicotinic acetylcholine receptors in brain regions involved in emotion processing, contributing to the persistence of memory (Braidia et al. 2014; Kutlu and Gould 2015; Lima et al. 2013; Vigorito et al. 2013). AChE is the enzyme responsible for terminating cholinergic neurotransmission by cleaving acetylcholine into choline and acetate at synaptic cleft (Soreq and Seidman 2001). Studies have shown that increased acetylcholine levels in the CNS play a crucial role in cognitive functions (Changeux et al. 2015; Lendvai et al. 2013) and thus, AChE activity must be tightly regulated. A significant increase in brain AChE activity of zebrafish immediately after a single CAS exposure has been previously reported (Canzian et al. 2017), suggesting an involvement of acetylcholine metabolism in fear responses. Interestingly, this effect seems to be not persistent since AChE activity did not change 24 h after CAS exposure. Here we demonstrate that brain AChE activity significantly increased in nicotine/CAS group after post-training session in animals tested in the aversive, but not in the altered context. In this protocol, considering that nicotine and CAS did not alter the enzyme activity *per se*, our data reflect an influence of the aversive context in nicotine-treated fish. Although different effects were previously reported in nicotine-treated animals (Ijomone and Nwoha 2015), these data reinforce that nicotine acts on AChE depending on species and exposure period. Because activation of nicotinic acetylcholine receptors facilitates long-term fear memories (Kutlu and Gould 2015), the increased AChE activity could be a compensatory mechanism to regulate cholinergic neurotransmission in zebrafish CNS. Noteworthy, the

differences observed herein support the involvement of cholinergic responses in zebrafish contextual fear conditioning models.

To our knowledge, this is the first study showing a positive modulation of nicotine on contextual fear conditioning in zebrafish. Since nicotine stimulates brain AChE activity after reintroducing CAS-exposed animals to the aversive context, we suggest an involvement of cholinergic signaling in associative learning and fear-like responses. These data reinforce the use of zebrafish in future investigation to clarify the mechanisms underlying nicotine actions in contextual fear conditioning protocols, complementing the existent rodent approaches.

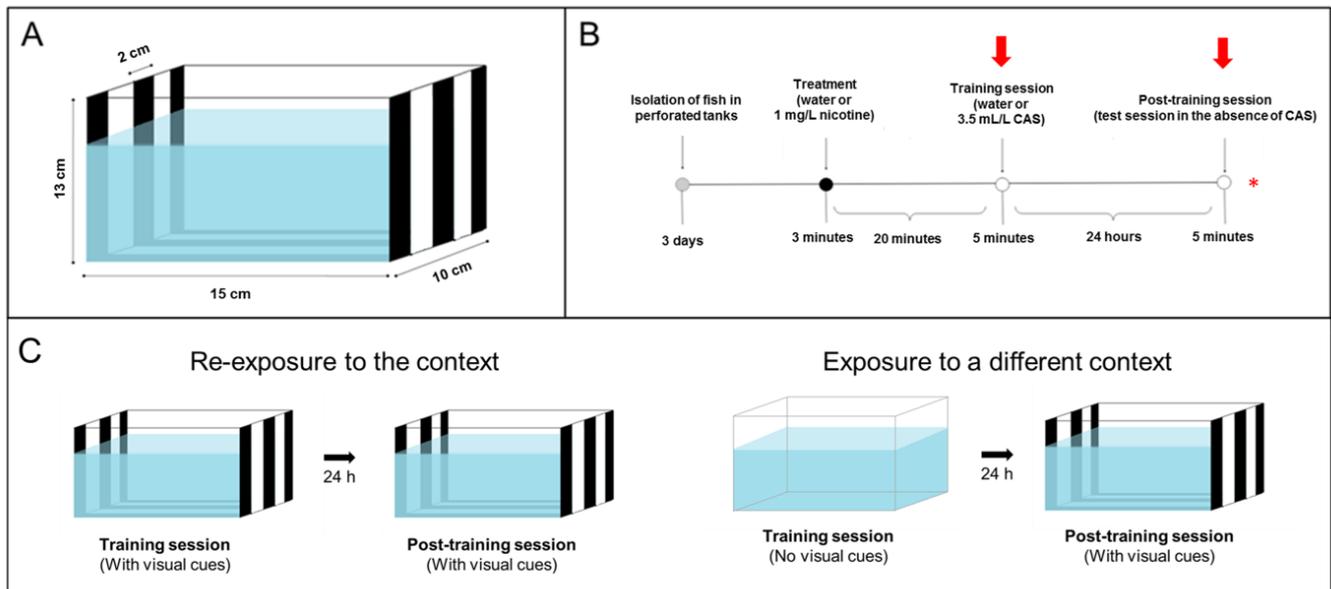
## References

- Barik J, Wonnacott S (2009) Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS. *Handb Exp Pharmacol*: 173-207.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Braida D, Ponzoni L, Martucci R, Sparatore F, Gotti C, Sala M (2014) Role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) on learning and memory in zebrafish. *Psychopharmacology (Berl)* 231: 1975-85.
- Canzian J, Fontana BD, Quadros VA, Rosemberg DB (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.
- Changeux JP, Corringier PJ, Maskos U (2015) The nicotinic acetylcholine receptor: From molecular biology to cognition. *Neuropharmacology* 96: 135-6.
- Dahlin M, Joneborg N, Runeson B (2005) Stress and depression among medical students: a cross-sectional study. *Med Educ* 39: 594-604.
- Davis JA, Gould TJ (2006) The effects of DHBE and MLA on nicotine-induced enhancement of contextual fear conditioning in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)* 184: 345-52.
- Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, Elkhayat SI, Bartels BK, Tien AK, Tien DH, Mohnot S, Beeson E, Glasgow E, Amri H, Zukowska Z, Kalueff AV (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res* 205: 38-44.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
- File SE, Cheeta S, Kenny PJ (2000) Neurobiological mechanisms by which nicotine mediates different types of anxiety. *Eur J Pharmacol* 393: 231-6.
- Fontana BD, Meinerz DL, Rosa LV, Mezzomo NJ, Silveira A, Giuliani GS, Quadros VA, Filho GL, Blaser RE, Rosemberg DB (2016) Modulatory action of taurine on ethanol-induced aggressive behavior in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav* 141: 18-27.
- Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A (2000) Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 67: 773-82.
- Goosens KA, Maren S (2001) Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learn Mem* 8: 148-55.
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assuncao JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Loveland J, Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliot D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Begum S, Mortimore B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Lloyd C, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisin C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gildershorp R, Griffiths C, Manthravadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J, Tromans A, Grafham D, Sukec C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J,

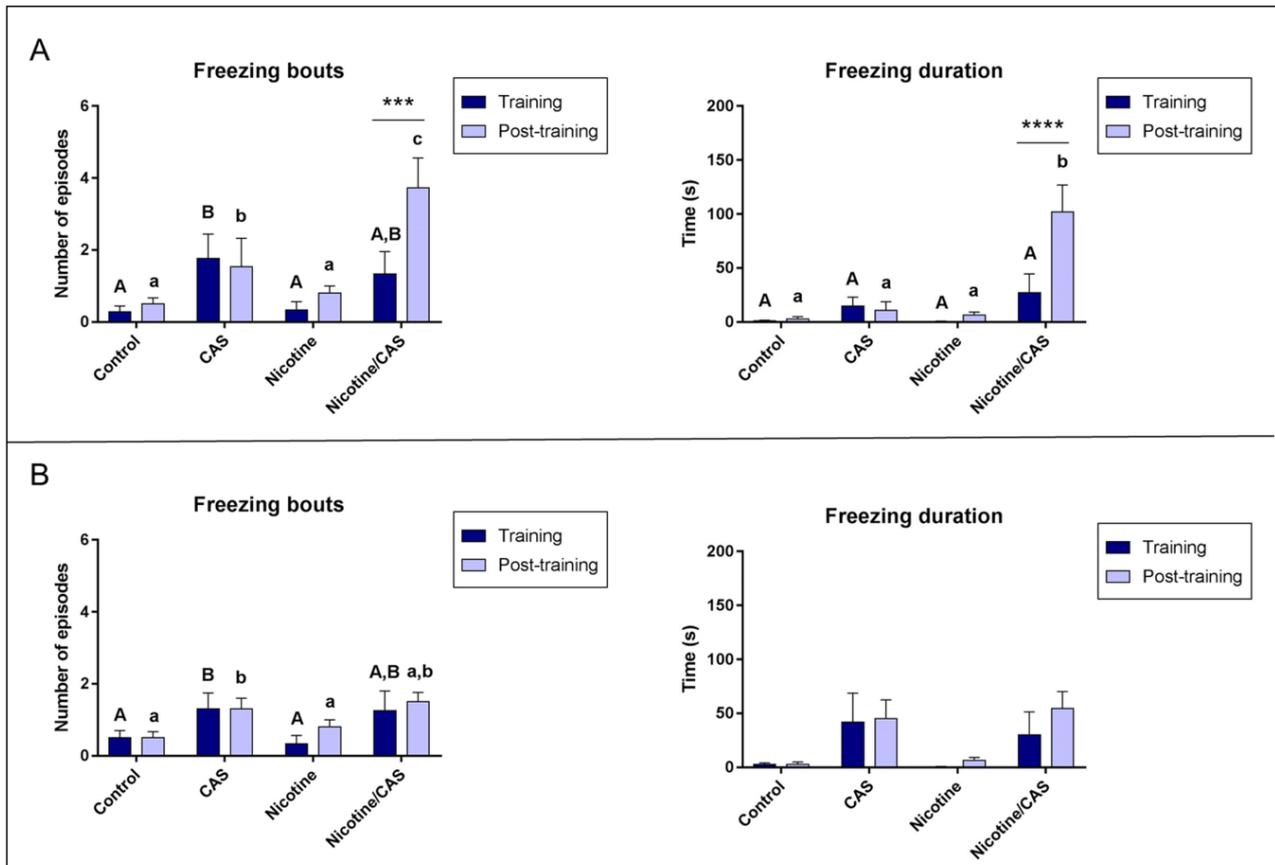
- Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly D, Bird C, Palmer S, Gehring I, Berger A, Dooley CM, Ersan-Urun Z, Eser C, Geiger H, Geisler M, Karotki L, Kim A, Konantz J, Konantz M, Oberlander M, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Lanz C, Raddatz G, Osoegawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Schuster SC, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SM, Enright A, Geisler R, Plasterk RH, Lee C, Westerfield M, de Jong PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nusslein-Volhard C, Hubbard TJ, Roest Crollius H, Rogers J, Stemple DL (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498-503.
- Ijomone OM, Nwoha PU (2015) Nicotine inhibits hippocampal and striatal acetylcholinesterase activities, and demonstrates dual action on adult neuronal proliferation and maturation. *Pathophysiology* 22: 231-9.
- Jesuthasan S (2012) Fear, anxiety, and control in the zebrafish. *Dev Neurobiol* 72: 395-403.
- Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE (2011) Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* 147: 509-24.
- Kalueff AV, Gebhardt M, Stewart AM, Cachat JM, Brimmer M, Chawla JS, Craddock C, Kyzar EJ, Roth A, Landsman S, Gaikwad S, Robinson K, Baatrup E, Tierney K, Shamchuk A, Norton W, Miller N, Nicolson T, Braubach O, Gilman CP, Pittman J, Rosemberg DB, Gerlai R, Echevarria D, Lamb E, Neuhauss SC, 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: 70-86.
- Kim JJ, Jung MW (2006) Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev* 30: 188-202.
- Klee EW, Ebbert JO, Schneider H, Hurt RD, Ekker SC (2011) Zebrafish for the study of the biological effects of nicotine. *Nicotine Tob Res* 13: 301-12.
- Kutlu MG, Gould TJ (2015) Nicotine modulation of fear memories and anxiety: Implications for learning and anxiety disorders. *Biochem Pharmacol* 97: 498-511.
- Lendvai B, Kassai F, Szajli A, Nemethy Z (2013) alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition. *Brain Res Bull* 93: 86-96.
- Levin ED, Limpuangthip J, Rachakonda T, Peterson M (2006) Timing of nicotine effects on learning in zebrafish. *Psychopharmacology (Berl)* 184: 547-52.
- Levin ED, Rezvani AH (2000) Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. *Eur J Pharmacol* 393: 141-6.
- Lima MG, Silva RX, Silva Sde N, Rodrigues Ldo S, Oliveira KR, Batista Ede J, Maximino C, Herculano AM (2016) Time-dependent sensitization of stress responses in zebrafish: A putative model for post-traumatic stress disorder. *Behav Processes* 128: 70-82.
- Lima RH, Radiske A, Kohler CA, Gonzalez MC, Bevilaqua LR, Rossato JI, Medina JH, Cammarota M (2013) Nicotine modulates the long-lasting storage of fear memory. *Learn Mem* 20: 120-4.
- Maximino C, de Brito TM, da Silva Batista AW, Herculano AM, Morato S, Gouveia A, Jr. (2010) Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behav Brain Res* 214: 157-71.
- McEwen BS (1998) Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 840: 33-44.
- Ogawa S, Nathan FM, Parhar IS (2014) Habenular kisspeptin modulates fear in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 3841-6.
- Oliveira TA, Koakoski G, da Motta AC, Piatto AL, Barreto RE, Volpato GL, Barcellos LJ (2014) Death-associated odors induce stress in zebrafish. *Horm Behav* 65: 340-4.
- Quadros VA, Silveira A, Giuliani GS, Didonet F, Silveira AS, Nunes ME, Silva TO, Loro VL, Rosemberg DB (2016) Strain- and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. *Behav Processes* 122: 1-11.
- Rehnberg BG, Smith RJF, Sloley BD (1987) The reaction of pearl dace (Pisces, Cyprinidae) to alarm substance: time-course of behavior, brain amines, and stress physiology. *Canadian Journal of Zoology* 65: 2916.
- Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10: 423-33.
- Rosemberg DB, da Rocha RF, Rico EP, Zanotto-Filho A, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD, Moreira JC, Klamt F, Souza DO (2010) Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience* 171: 683-92.
- Ruhl T, Zeymer M, von der Emde G (2017) Cannabinoid modulation of zebrafish fear learning and its functional analysis investigated by c-Fos expression. *Pharmacol Biochem Behav* 153: 18-31.
- Shin LM, Liberzon I (2010) The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology* 35: 169-91.
- Signor C, Mello CF, Porto GP, Ribeiro DA, Rubin MA (2014) Spermidine improves fear memory persistence. *Eur J Pharmacol* 730: 72-6.
- Singer ML, Oreschak K, Rhinehart Z, Robison BD (2016) Anxiolytic effects of fluoxetine and nicotine exposure on exploratory behavior in zebrafish. *PeerJ* 4: e2352.
- Singewald N, Schmuckermair C, Whittle N, Holmes A, Ressler KJ (2015) Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. *Pharmacol Ther* 149: 150-90.
- Soreq H, Seidman S (2001) Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2: 294-302.
- Speedie N, Gerlai R (2008) Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 188: 168-77.
- Stewart AM, Yang E, Nguyen M, Kalueff AV (2014) Developing zebrafish models relevant to PTSD and other trauma- and stressor-related disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 55: 67-79.
- Subramaniyan M, Dani JA (2015) Dopaminergic and cholinergic learning mechanisms in nicotine addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1349: 46-63.
- Vigorito M, Cao J, Li MD, Chang SL (2013) Acquisition and long-term retention of spatial learning in the human immunodeficiency virus-1 transgenic rat: effects of repeated nicotine treatment. *J Neurovirol* 19: 157-65.

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 KM, Stewart A, Gilder T, Beeson E, Zapolsky I, Wu N, Cachat J, Kalueff AV (2010) Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 208: 450-7.

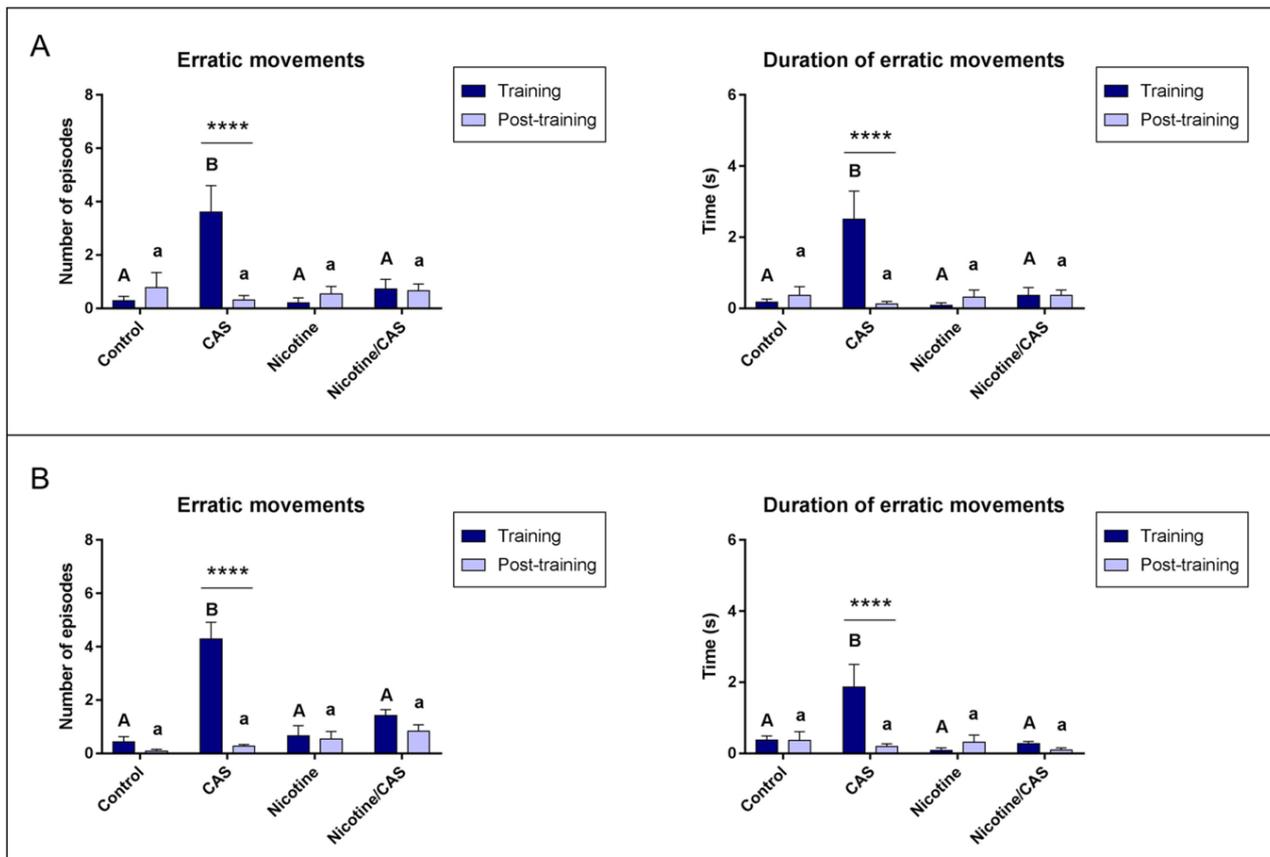
## Figures



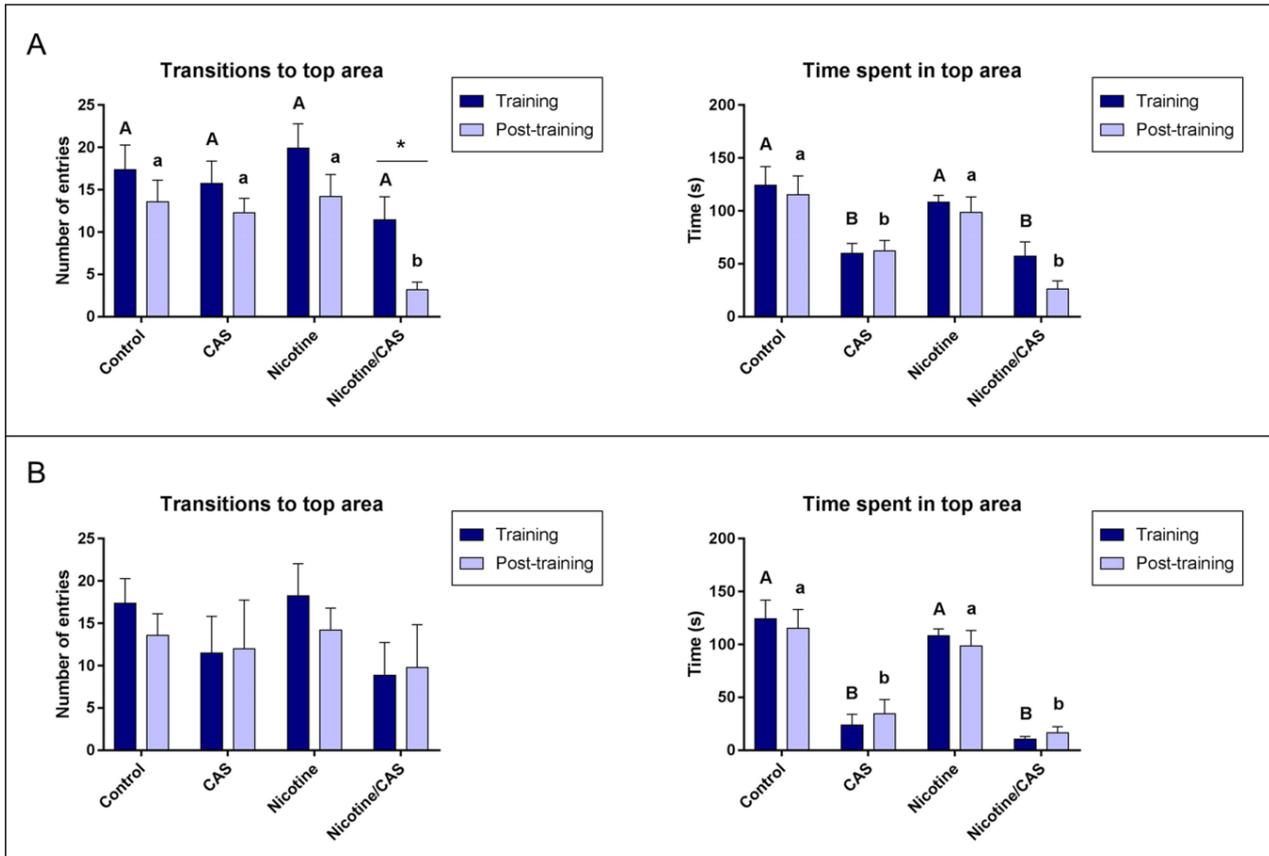
**Fig. 1. Apparatus and contextual fear conditioning protocol in zebrafish.** (A) Experimental tank with visual cues (black and white stripes) and their respective dimensions. (B) Pharmacological manipulations and experimental design. Zebrafish were kept during 3 days before the experiments into perforated Plexiglas tanks and further exposed to water or 1 mg/L nicotine for 3 min. After 20 min, fish were transferred to the experimental tank in the presence or absence of 3.5 mL/L CAS for 5 min (training session). Post-training session was performed 24 h later, except that no CAS was added. Arrows indicate video recording events and the asterisk represents euthanasia and determination of brain AChE activity. (C) Experimental tanks used to assess the contextual influence in zebrafish behavioral responses.



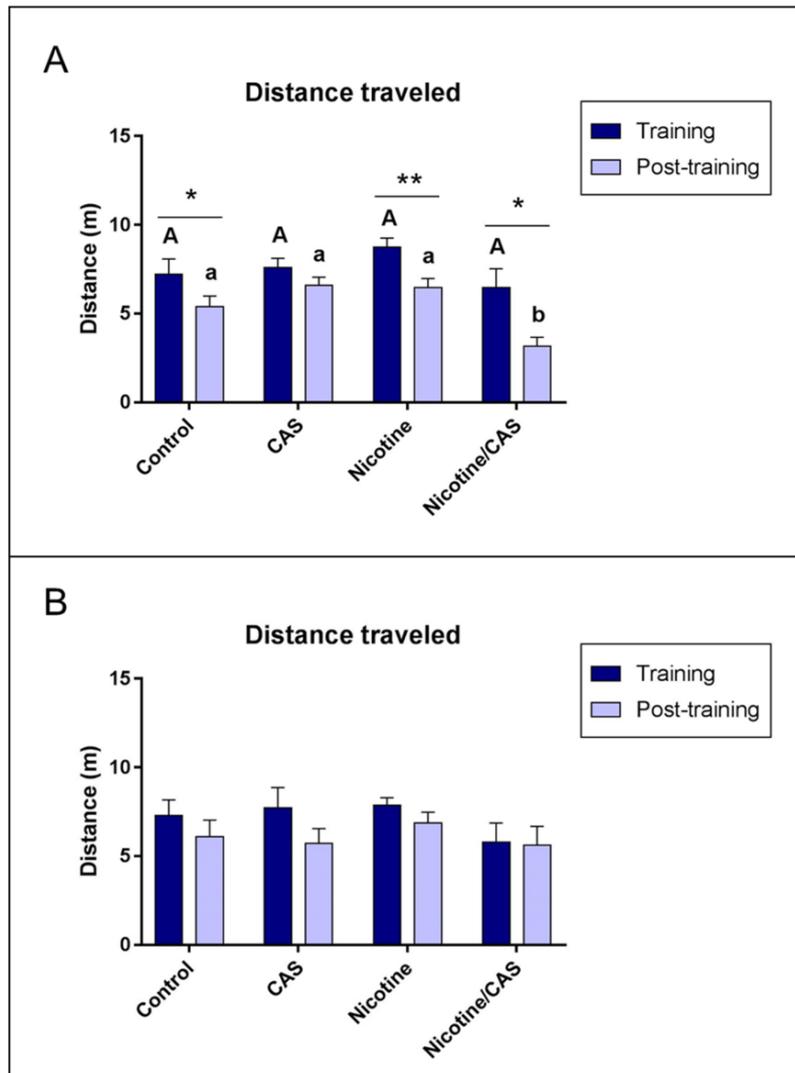
**Fig. 2. Freezing behavior at training and post-training sessions. (A)** Freezing responses in zebrafish reintroduced to the aversive context at post-training session. **(B)** Freezing responses in zebrafish tested in the altered context at post-training session. Data were expressed as means  $\pm$  S.E.M and analyzed by repeated measures ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test. Distinct capital and lower case letters denote differences among groups at training and post-training sessions, respectively. The asterisks denote statistical differences at training and post-training sessions in a same experimental group. Significance level was set at  $p < 0.05$  (\*\*\*)  $p < 0.005$ , (\*\*\*\*)  $p < 0.001$ ,  $n = 10-15$  per group).



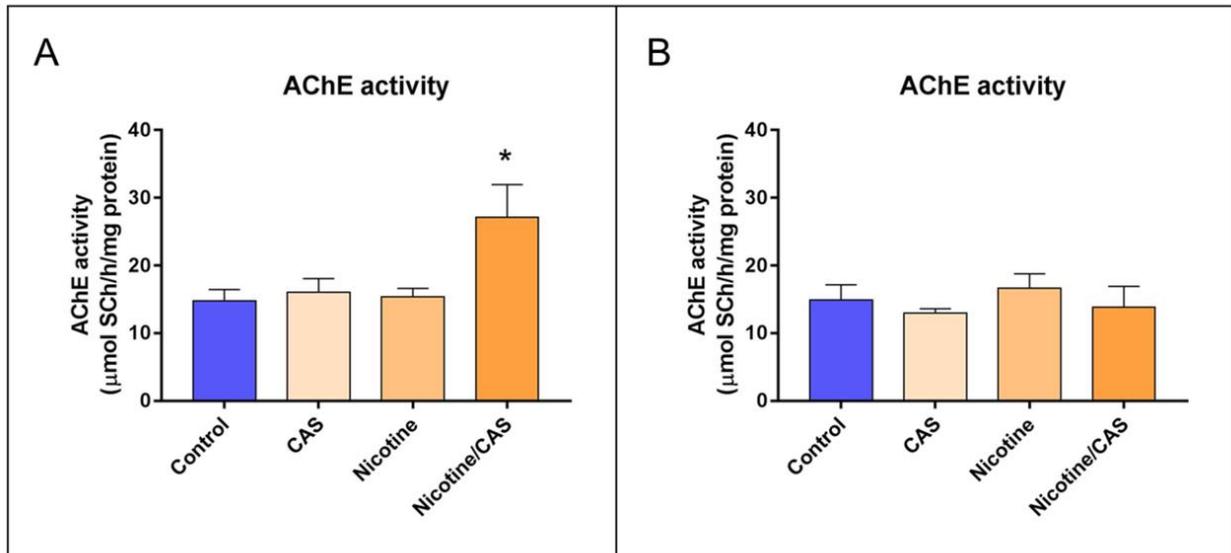
**Fig. 3. Erratic movements at training and post-training sessions.** (A) Number and duration of erratic movements in zebrafish reintroduced to the aversive context at post-training session. (B) Number and duration of erratic movements in zebrafish tested in the altered context at post-training session. Data were expressed as means  $\pm$  S.E.M and analyzed by repeated measures ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test. Distinct capital and lower case letters denote differences among groups at training and post-training sessions, respectively. The asterisks denote statistical differences at training and post-training sessions in a same experimental group. Significance level was set at  $p < 0.05$  (\*\*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 10-15$  per group).



**Fig. 4. Vertical swimming of zebrafish at training and post-training sessions. (A)** Number of transitions and time spent in the upper segment in zebrafish reintroduced to the aversive context at post-training session. **(B)** Number of transitions and time spent in the upper segment in zebrafish tested in the altered context at post-training session. Data were expressed as means  $\pm$  S.E.M and analyzed by repeated measures ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test. Distinct capital and lower case letters denote differences among groups at training and post-training sessions, respectively. The asterisks denote statistical differences at training and post-training sessions in a same experimental group. Significance level was set at  $p < 0.05$  ( $*p < 0.05$ ,  $n = 10-15$  per group).



**Fig. 5. Locomotor parameter at training and post-training sessions.** (A) Distance traveled in zebrafish reintroduced to the aversive context at post-training session. (B) Distance traveled in zebrafish tested in the altered context at post-training session. Data were expressed as means  $\pm$  S.E.M and analyzed by repeated measures ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test. Distinct capital and lower case letters denote differences among groups at training and post-training sessions, respectively. The asterisks denote statistical differences at training and post-training sessions in a same experimental group. Significance level was set at  $p < 0.05$  ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $n = 10-15$  per group).



**Fig. 6. Brain AChE activity.** (A) Zebrafish reintroduced to the aversive context at post-training session. (B) Zebrafish tested in the altered context at post-training session. Data were expressed as means  $\pm$  S.E.M and analyzed by two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test. The asterisk denotes statistical differences when compared to control group. Significance level was set at  $p < 0.05$  ( $*p < 0.05$ ,  $n = 6-8$  per group).

## 5. CONCLUSÃO

A presente dissertação demonstra que a nicotina é capaz de modular respostas de medo condicionado contextual em peixe-zebra, bem como parâmetros relacionados ao sistema colinérgico. Essa conclusão pode ser sustentada pelos seguintes achados:

- Apesar da nicotina prevenir o aumento dos movimentos erráticos induzidos pela CAS na sessão treino, o grupo nicotina/CAS apresentou um aumento marcante na duração e no número de episódios de congelamento quando reintroduzido no contexto aversivo. No entanto, animais submetidos a um contexto diferente não apresentaram tais alterações.

- A nicotina diminuiu o número de transições verticais e a distância percorrida em animais reintroduzidos somente no contexto aversivo. Ademais, a exposição à CAS diminuiu o tempo no topo de animais tratados ou não com nicotina, tanto na seção treino como na seção pós-treino de modo independente de contexto, sugerindo um parâmetro que poderia refletir sensibilização induzida por CAS.

- A nicotina aumentou a atividade da AChE em peixes expostos à CAS. No entanto, não foi observada alteração enzimática em animais submetidos a contextos diferentes, o que indica uma influência da sinalização colinérgica no medo condicionado contextual em peixe-zebra.

## **6. PERSPECTIVAS DO ESTUDO**

Este trabalho mostrou que a exposição à nicotina e à CAS exhibe fenótipos comportamentais de exacerbação do medo em animais submetidos ao teste de medo condicionado contextual. Dessa maneira, as perspectivas do estudo são:

- Investigar os efeitos da nicotina na consolidação e evocação da memória aversiva no teste de medo condicionado contextual;
- Avaliar os efeitos da exposição crônica à nicotina na aquisição da memória utilizando o teste de medo condicionado contextual;
- Verificar se a nicotina é capaz de modular parâmetros relacionados ao estresse oxidativo;
- Explorar os efeitos promovidos pela nicotina sobre alterações neuroquímicas de animais submetidos a agentes estressores;
- Avaliar os efeitos promovidos pelo antagonismo seletivo dos receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina em respostas comportamentais e bioquímicas.

## REFERÊNCIAS

AHMED, O.; SEGUIN, D.; GERLAI, R. An automated predator avoidance task in zebrafish. **Behav Brain Res**, v.216, n.1, p.166-171, 2011.

BARIK, J. e WONNACOTT, S. Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS. **Handb Exp Pharmacol**, p.173-207, 2009.

BAGATINI, P. B. et al. An evaluation of aversive memory and hippocampal oxidative status in streptozotocin-induced diabetic rats treated with resveratrol. **Neurosci. Lett**, v.636, p.184-189, 2017.

BRAIDA, D.; et al. Role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) on learning and memory in zebrafish. **Psychopharmacology**,v.231, p.1975-1985, 2014.

BEER, A. L.; VARTAK, D.; GREENLEE, M. W. Nicotine facilitates memory consolidation in perceptual learning. **Neuropharmacology**, 64, 443e451, 2013.

BLASER, R. E.; CHADWICK, L.; MCGINNIS, G. C. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav Brain Res**, v.208, n.1, p.56-62, 2010.

BROIDE, R. S. e LESLIE, F. M. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. **Mol Neurobiol**, v.20, n1, p.1-16, 1999.

CHANGEUX, J.P.; CORRINGER, P.J.; MASKOS, U. The nicotinic acetylcholine receptor: From molecular biology to cognition. **Neuropharmacology**,v.96, p.135-136, 2015.

CANZIAN, J. et al. 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**, v.320, p.255–263, 2017.

CARAMILLO, E. M. e ECHEVARRIA, D. J. Alzheimer's disease in the zebrafish: where can we take it? **Behav Pharmacol**.(2 and 3 - Special Issue):179-186, 2015.

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

FONTANA, B. D. et al. Modulatory action of taurine on ethanol-induced aggressive behavior in zebrafish. **Pharmacol Biochem Behav**, v.141, p.18-27, 2016.

FONTANA, B. D. et al. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. **ExpNeurol**, v.299, p.157-171, 2018

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(1), p.23-34, 2017.

GRAY, J. A. The Psychology of Fear and Stress. Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

HOGG, R. C.; RAGGENBASS, M.; BERTRAND, D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v.147, p.1–46, 2003.

HO, R. X. et al. MINAR1 is a Notch2-binding protein that inhibits angiogenesis and breast cancer growth. **J Mol Cell Biol**. Epub antes da impressão, 2018.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v.496, n.7446, p.498–503, 2013.

IJOMONE, O. M. e NWOHA. P. U. Nicotine inhibits hippocampal and striatal acetylcholinesterase activities, and demonstrates dual action on adult neuronal proliferation and maturation. **Pathophysiology**, v.22, p.231-239, 2015.

JESUTHASAN, S. Fear, anxiety, and control in the zebrafish. **Dev Neurobiol**, v.72, n.3, p.395-403, 2012.

JOHANSEN, J. P. et al. Molecular Mechanisms of Fear Learning And Memory. **Cell**, v.147, n.3, p.509–524, 2011.

KALUEFF A. V. et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v.10, p.70-86, 2013.

KENNEY, J. W. et al. Contextual fear conditioning in zebrafish. **Learn. Mem**, v.24, p.516–523, 2017.

KLEE, E. W. et al. Zebrafish for the study of the biological effects of nicotine. **Nicotine Tob Res**, v.13, p.301-312, 2011.

KUTLU, M. G. e GOULD, T. J. Nicotine Modulation of Fear Memories and Anxiety: Implications for Learning and Anxiety Disorders. **Biochem. pharmacol.** 15;97(4), p.498-511, 2015.

KUTLU, M. G. e GOULD, T. J. Nicotinic modulation of hippocampal cell signaling and associated effects on learning and memory. **Physiolbehav**, v.155, p.162–171, 2016.

KYSIL, E. V. et al. Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. **Zebrafish**, v.14, n.3, 2017.

- LANDGRAF R. e WIGGER, A. High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. **Behavior Genetics**, v. 32, n. 5, p. 301–314, 2002.
- LENDVAI, B. alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition. **Brain Res Bull**v.93, p.86-96, 2013.
- LEUNG, L. C. e MOURRAIN, P. Drug discovery: Zebrafish uncover novel antipsychotics. **Nat Chem Biol**, v.12 (7), p.468-469, 2016
- LEVIN, E.D. Timing of nicotine effects on learning in zebrafish. **Psychopharmacology (Berl)** v.184, p.547-552, 2006.
- LEVIN, E. D.; BENCAN, Z.; CERUTTI, D. T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiol Behav**,v.90(1), p.54-58, 2007.
- LIMA, M. G. Time-dependent sensitization of stress responses in zebrafish: A putative model for post-traumatic stress disorder. **Behav Processes**, v.128, p.70-82, 2016.
- MAY, Z. et al. Object recognition memory in zebrafish. **Behav Brain Res**, v.296, p.199–210, 2016.
- MAXIMINO, C. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. **Behav Brain Res**, v.214, p.157-171, 2010.
- MAXIMINO, C. "Limbic associative" and "autonomic" amygdala in teleosts: a review of the evidence. **J Chem Neuroanat**, v.48-49, p.1-13, 2013.
- MCEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. **Ann N Y Acad Sci**, v.840, p.33-44, 1998
- MEZZOMO, N. J. et al. Understanding taurine CNS activity using alternative zebrafish models. **Neurosci Biobehav Rev**, v.83, p.525-539, 2017.
- MOURABIT, S. A. Alarm substance from adult zebrafish alters early embryonic development in offspring. **BiolLett**, v.6, n.4, p.525-528, 2010.
- MULLER, T. E. et al. Chronic Treatment with Paraquat Induces Brain Injury, Changes in Antioxidant Defenses System, and Modulates Behavioral Functions in Zebrafish. **Mol Neurobiol**, v.54(6), p.925-3934, 2017.
- OGAWA, S.; NATHAN, F. M.; PARHAR, I. S. Habenular kisspeptin modulates fear in the zebrafish. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.111, n.10, p.3841-3846, 2014.

- PANNEERSELVAN, N. e RAGUNATHANET, M. Targeting expression of adenosine receptors during hypoxia induced angiogenesis - A study using zebrafish model. **Biomed Pharmacother.** v.99, p.101-112, 2018.
- PERATHONER, S.; CORDERO-MALDONADO, M. L.; CRAWFORD, A. D. Exploring the Role of the Amygdala in Emotional Memory and Motivational Behavior. **J neurosci. res.** v.4, p.445–462, 2016.
- POULOS, A. M. Conditioning-and time-dependent increases in context fear and generalization. **Learn Mem,** v.23, n.7, p.379-85, 2016.
- 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.
- ROSA, L. V. et al. Different effects of caffeine on behavioral neurophenotypes of two zebrafish populations. **PharmacolBiochemBehav,** v.165, p.1-8, 2017.
- RICO, E. P. et al. Adenosine deaminase activity and gene expression patterns are altered after chronic ethanol exposure in zebrafish brain.**NeurotoxicolTeratol.** v.65, p.14-18, 2017.
- ROSEMBERG, D. B. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS One,** v.6, n.5, 2011.
- ROOZENDAAL, B.; MCEWEN, B.S.; CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nat Rev Neurosci,** v.10, p.423-433, 2009.
- RUHL, T.; ZEYMER, M.; VON DER EMDE, G. Cannabinoid modulation of zebrafish fear learning and its functional analysis investigated by c-Fos expression. **Pharmacol Biochem Behav** v.153, p.18-31, 2017.
- SABOGA-NUNES, L.; LEVIN-ZAMIR, D.; RABIUS, V. Tobacco still a major killer-will we achieve the end game? **Eur J Public Health,**v.27(suppl\_4), p.22-25, 2017.
- SHIN, R-M. Cellular Mechanisms in the Amygdala Involved in Memory of Fear Conditioning. In: Ferry, B. The Amygdala - A Discrete Multitasking Manager, Ed. InTech. 2012.
- SMITH R.J.F. Alarm signals in fishes. **Rev. Fish Biol. Fish.** v.2, p.33–63, 1992.
- SPEEDIE, N. e GERLAI, R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav Brain Res,** v.188, n.1, p.168-177, 2008.

SOREQ, H. e SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nat Rev Neurosci**, v.2, p.294-302, 2001.

STEWART, A.M. et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends Neurosci**, v.37, n.5, p.264-78, 2014.

STEWART, A. M. et al. Anxiogenic-like effects of chronic nicotine exposure in zebrafish. **Pharmacol Biochem Behav**, v.139, p.112–120, 2015.

TANI, Y. et al. Pharmacological characterization of nicotinic receptor-mediated acetylcholine release in rat brain—an in vivo microdialysis study. **Eur J Pharmacol**, v.351, p.181–188, 1998.

XU, X. et al. Active avoidance conditioning in zebrafish (*Danio rerio*). **Neurobiol Learn Mem** v.87, n.1, p.72-77, 2007.

WONNACOTT, S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. **Trends Neurosci**, v.20, n2, p.92-8, 1997.

-WHO

HYPERLINK

"file:///C:/Users/Cliente/Dropbox/LaNE%20UFSM/Pasta%20Pessoal/Paola/"<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/depression-anxiety-treatment/en/> acessado em janeiro de 2018.

## ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA/UFSM



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 Rosemberg 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 Rosemberg 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-anestésicas 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

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

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

# ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO



HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS



Role: **Author** | Username: dbroseberg@gmail.com



**Submissions Being Processed for Author Denis Roseberg**

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>	PSPH-D-18-00030	Nicotine modulates contextual fear conditioning responses in zebrafish: putative involvement of brain acetylcholinesterase in associative learning	25 Jan 2018	25 Jan 2018	New Submission

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

[<< Author Main Menu](#)