

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

Vanessa de Matas Soares

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA A NICOTINA  
SOBRE A ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM  
CÉREBRO DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Prof. Dr. Mauricio Reis Bogo

Orientador

Porto Alegre

2009

Vanessa de Matas Soares

**Efeitos da exposição aguda a nicotina sobre a atividade da acetilcolinesterase em  
cérebro do Peixe-Zebra (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada como requisito para a  
obtenção do grau de Mestre pelo programa de  
Pós Graduação em Biologia Celular e  
Molecular da Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. Maurício Reis Bogo

Porto Alegre

2009

Dedico este trabalho as minhas filhas Manoela e Maria Paula, que são a minha inspiração  
de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu professor orientador Prof. Dr. Maurício Reis Bogo pela sua orientação e generosidade ao longo desta minha jornada.

Agradeço a Prof. Dra. Carla Bonan pelo apoio e atenção, a Dra. Gabriele Ghisleni pela amizade e ajuda essencial no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Kelly, Katu, Eduardo, Denis, Fernanda, Renata, Cladinara, e aos professores Rosane e Renato, que de alguma maneira me ajudaram a executar esta jornada, seja no trabalho de bancada, na hora de estudar, na hora de discutir algum resultado, ou na pausa do cafezinho, momento fundamental para aliviar a tensão. O apoio de vocês foi fundamental para eu conseguir terminar o mestrado.

Aos meus pais Mario e Rosa, as minhas queridas irmãs, meus cunhados, as minhas filhas, e aos meus amigos Ana, Chico, Elenara, Gibsi, por me aguentarem estes dois anos, muitas vezes preocupada, cansada e focada em realizar todas as etapas sem perder a esperança que eu conseguiria, sempre com uma palavra de incentivo e carinho. Vocês torceram por mim, e eu jamais vou esquecer.

Ao Dr. Carlos Alberto Costa, que mais uma vez acreditou e também torceu por mim, sem o seu incentivo e apoio talvez tivesse sido impossível concluir este desafio.

Por fim, agradeço a minha grande amiga e colega de jornada, Maria Cristina, a Tininha. Que foi a peça fundamental neste mestrado, primeiro por me incentivar a fazê-lo, depois por todas as horas de estudo juntas, todo o trabalho de bancada juntas e todas as horas de empurrões, puxões de orelhas, e mais incentivo. Tu és uma amiga leal e uma pessoa generosa que eu tenho a felicidade de ter conhecido.

## RESUMO

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno peixe teleósteo de água doce, pertencente à família *Cyprinidae*, que pode ser facilmente mantido dentro de aquários em laboratórios. A maioria dos seus genes já é conhecida, e o seu genoma tem uma relação de similaridade com o genoma humano. A nicotina é um alcalóide que está presente nas folhas do tabaco, atua nos receptores colinérgicos nicotínicos centrais e periféricos que são ativados e depois inibidos pela própria droga. A nicotina estimula a liberação de vários neurotransmissores incluindo a acetilcolina (ACh), que é reconhecida pelos receptores colinérgicos nicotínicos, dopamina, norepinefrina, serotonina e glutamato. Efeitos tóxicos e farmacológicos causados pela exposição à nicotina têm sido frequentemente relatados na literatura. A neurotransmissão mediada pela ACh é fundamental para o correto funcionamento do SNC. Baseando-se em suas diferentes afinidades por agentes que mimetizam a ação da ACh, os receptores colinérgicos são divididos em duas classes distintas: muscarínicos e nicotínicos. Os receptores nicotínicos são ionotrópicos e reconhecem a ACh e a nicotina. Uma vez liberada nas sinapses, a ACh é degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) em acetato e colina, sendo esta última recaptada pelo neurônio. Com a inibição da AChE, o neurotransmissor ACh não é hidrolizado nas junções neuromusculares, causando uma quantidade anormal de ACh nestes locais, levando a possíveis efeitos tóxicos. O gene da AChE já foi clonado e sequenciado e esta atividade enzimática já foi detectada em cérebro de peixe-zebra. Considerando que: (i) a exposição à nicotina pode causar danos a performance neurocomportamental e afetar o SNC, (ii) em peixe-zebra a nicotina apresenta uma curva de resposta de dose em U invertido, com moderadas doses melhorando as funções cognitivas e altas doses com menos efeitos positivos, e (iii) o sistema colinérgico em peixe-zebra já foi descrito; o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos *in vitro* e *in vivo* do tratamento agudo com nicotina sob a atividade da AChE no cérebro do peixe-zebra. O tratamento *in vitro* com nicotina nas doses de 500 (11,02%) e 1000 $\mu$ M (7,73%) promoveu inibição na atividade da AChE. No estudo *in vivo* o tratamento agudo com nicotina (3min e 20 min) não acarretou modificações significativas na atividade da enzima no cérebro do peixe-zebra, nas doses testadas. Ainda assim, possíveis efeitos do tratamento crônico da nicotina sob a atividade da AChE devem ser pesquisados.

*Palavras chaves:* Efeito do tratamento agudo. Nicotina. Atividade da Acetilcolinesterase. Peixe-zebra.

## ABSTRACT

The zebrafish (*Danio rerio*) is a small freshwater teleost fish, belonging to family *Cyprinidae*, which can easily be kept in aquariums in laboratories. Most of its genes are already known, and its genome has a similarity with the human genome. Nicotine is an alkaloid that is present in the leaves of tobacco, binding to cholinergic nicotinic receptors in the central and peripheral nervous system that are initially activated and then inhibited. Nicotine stimulates the release of several neurotransmitters including acetylcholine (ACh), which is recognized by nicotinic cholinergic receptors, dopamine, norepinephrine, serotonin and glutamate. Pharmacological and toxicological effects of nicotine exposure have been frequently reported in literature. The neurotransmission mediated by ACh is essential for the proper functioning of the central nervous system. Based on their different affinities by agents that mimic the action of ACh, cholinergic receptors are divided into different classes: muscarinic and nicotinic. The nicotinic receptors are inotropic and recognize the ACh and nicotine. Once released in the synapses, ACh is degraded by the enzyme acetylcholinesterase (AChE) to acetate and choline, the latter being recaptured by the neuron. With the inhibition of AChE, the neurotransmitter ACh is not hydrolyzed in neuromuscular junctions, causing an abnormal amount of ACh in that area, leading to possible effects toxic. The gene that encodes AChE has been cloned and sequenced and this enzyme activity has been detected in zebrafish brain. Considering that: (i) exposure of nicotine may impair neurobehavioral performance and affect the central nervous system cholinergic pathways; (ii) in zebrafish, nicotine presented an inverted U-shaped dose-response curve with moderate doses improving cognitive function and higher doses having less of a positive effect, and (iii) zebrafish cholinergic system was already described, the aim of this study was to investigate the *in vitro* and *in vivo* acute effects of nicotine on acetylcholinesterase activity in zebrafish brain. The effect of nicotine *in vitro* promoted AChE inhibition at concentration of 500 (11, 02%) and 1000 $\mu$ M (7, 73%). The *in vivo* study of acute nicotine (3min and 20 min) did not alter significantly the enzyme activity in zebrafish brain at the doses tested. Still, possible effects of chronic treatment of nicotine on the activity of AChE must be searched.

Key words: Acute treatment. Nicotine. Acetylcholinesterase activity. Zebrafish.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>II</b>
<b>1. CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO</b>	<b>4</b>
1.1.1 Peixe-Zebra	4
1.1.2 Sistema Colinérgico	5
1.1.3. Nicotina	8
1.1.4 Nicotina e alterações comportamentais em peixe-zebra	9
<b>1.2 OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
1.2.1 Objetivos Geral	11
1.2.2 Objetivos Específicos	11
<b>2. CAPÍTULO 2 - MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL</b>	<b>12</b>
2.1. MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL	12
<b>3. CAPÍTULO 3</b>	<b>28</b>
<b>3. 1 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>30</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>35</b>

# 1. CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

## 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.1.1 Peixe-Zebra (*Danio rerio*)

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno peixe teleósteo de água doce, pertencente à família *Cyprinidae* que apresenta inúmeras características vantajosas que primeiramente o tornaram um modelo vertebrado proeminente para estudos da biologia do desenvolvimento e genética, e cujo potencial foi mais tarde estendido a outras áreas das ciências biológicas que incluem: o baixo custo, a fácil manipulação, o pouco espaço requerido para a sua manutenção e a rápida reprodução (um casal de adultos se reproduz uma vez por semana gerando em torno de 100-200 descendentes). O peixe-zebra combina a relevância de ser um vertebrado com a escala de estudo de um organismo invertebrado. O conhecimento acumulado proveniente do “Projeto Genoma Peixe-Zebra” (Barbazuk et al., 2000; Woods et al., 2000) aliado à capacidade de absorver rapidamente substâncias químicas diretamente da água fazem com que, cada vez mais, seja também utilizado como espécie modelo para estudos toxicológicos e de doenças humanas (Goldsmith, 2004; Hill et al., 2005).

As bases moleculares da neurobiologia têm sido extensivamente estudadas em peixe-zebra resultando na caracterização de muitos genes que estão envolvidos na formação de circuitos neuronais, em padrões de comportamento e nos mecanismos envolvidos na neuropatogênese (Vascotto et al., 1997; Guo, 2004). Muitos sistemas de neurotransmissão já foram identificados nesta espécie e incluem: glutamatérgico (Edwards e Michel, 2002), colinérgico (Behra et al., 2002; Clemente et al., 2004), dopaminérgico (Boehmler et al., 2004), serotoninérgico (Rink e Guo, 2004), histaminérgico (Kaslin e Panula, 2001), gabaérgico (Kim et al., 2004) e purinérgico (Kucenas et al., 2003).



Recentemente, o peixe-zebra, emergiu como um modelo complementar bastante útil para o estudo das funções neurocomportamentais incluindo recompensa e funções cognitivas. (Levin et al., 2007). Vários testes de comportamento têm sido realizados utilizando o peixe-zebra entre eles aqueles para estudar adição (Gerlai et al., 2000, Ninkovic et al., 2006), ansiedade e comportamento exploratório (Serra et al., 1999; Gerlai et al., 2000; Swain et al., 2004; Ninkovic et al., 2006), agressividade (Gerlai et al. 2000; Dlugos e Rabin, 2003), memória (Darland and Dowling, 2001; Wlliams et al., 2002, Swain et al., 2004; Carvan et al., 2004; Levin and Chen, 2004 Ninkovic et al., 2006), atividade locomotora (Gerlai et al., 2000; Anichtcnik et al., 2004), preferência social (Gerlai et al., 2000), escolha de acasalamento (Turnell et al., 2003) e “ousadia” (Gerlai et al. 2000, Wright et al., 2003).

### **1.1.2. Sistema Colinérgico**

A neurotransmissão mediada pela acetilcolina é fundamental para o correto funcionamento do sistema nervoso central, e representa o sistema neurotransmissor mais antigo do ponto de vista filogenético (Gotti e Clementi, 2004). Os neurônios colinérgicos inervam a musculatura voluntária do sistema somático e também são encontrados no sistema nervoso central (Soreq e Seidman, 2001).

Baseando-se em suas diferentes afinidades por agentes que mimetizam a ação da acetilcolina, os receptores colinérgicos são divididos em duas classes distintas: muscarínicos e nicotínicos (Tinsley et al., 2004). Os receptores muscarínicos são metabotrópicos e ligam-se à acetilcolina e à muscarina, um alcalóide presente em certos cogumelos venenosos (Francischi et al., 2005). Estes receptores são encontrados em gânglios do sistema nervoso periférico e nos órgãos efetadores autonômicos, como o coração, o músculo liso, o cérebro e glândulas exócrinas (Sarter e Parikh, 2005). Existem

cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5) que foram clonados e identificados farmacologicamente. Os receptores M1, M3 e M5 estão acoplados a uma proteína Gq/11, e alteram a atividade celular pela estimulação da fosfolipase C, e pela geração do segundo mensageiro IP3, o qual induz a liberação de cálcio intracelular e diacilglicerol (DAG). Contudo, os receptores M2 e M4 estão acoplados a uma proteína G<sub>i</sub> que induz sua reposta via inibição da adenilato ciclase (Caulfield and Birdsall, 1998; Uchiyama and Chess-Williams, 2004).

Os receptores nicotínicos são ionotrópicos e reconhecem a acetilcolina e a nicotina (Dani e De Biasi, 2001). Tais receptores se localizam no sistema nervoso central, na medula adrenal, nos gânglios autonômicos e na junção neuromuscular (Sarter e Parikh, 2005). Os receptores nicotínicos estão ligados a canais catiônicos e possuem uma estrutura pentamérica (McKay, et al., 2007). Estes receptores pertencem a uma família heterogênea que consiste em diferentes subtipos, os quais formam combinações homoméricas ou heteroméricas a partir de 12 diferentes subunidades ( $\alpha$ 2- $\alpha$ 10,  $\beta$ 2- $\beta$ 4) (Gotti e Clementi, 2004).

Uma vez liberada nas sinapses, a acetilcolina é degradada pela enzima acetilcolinesterase em acetato e colina, sendo esta última recaptada pelo neurônio. O sítio ativo da acetilcolinesterase é composto por uma tríade catalítica que contém resíduos de serina, de histidina e de um grupo ácido (glutamato ou aspartato). O mecanismo de hidrólise da acetilcolinesterase envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da acetilcolina, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina pela água recupera o sítio catalítico da enzima (Soreq e Seidman, 2001).

A ativação do sistema colinérgico foi demonstrada como sendo importante no desenvolvimento das estruturas cerebrais (Zirger et al., 2003). Interferências na

neurotransmissão colinérgica durante o desenvolvimento produzem danos estruturais com efeitos no comportamento (Hohmann, et al.,1988, 1991; Bachman et al., 1994; Slotkin, 1999). Agentes colinérgicos agindo sob os receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs), como a nicotina, apresentam efeitos no crescimento celular e apoptose (Lipton et al.,1988; Chan e Quik,1993; Pugh e Berg, 1994; Zheng et al., 1994; Hory-Lee e Frank, 1995; Schuller, 1995; 1988; Berger et al.,1998; Pugh e Margiotta, 2000; Svoboda et al., 2002). Para se estudar os efeitos da nicotina sobre estes receptores, o peixe-zebra demonstrou ser o modelo mais indicado (Zirger, et al., 2003).

Com a inibição da acetilcolinesterase, o neurotransmissor acetilcolina (ACh) não é hidrolisado nas junções sinápticas e nas junções neuromusculares, causando acúmulo de uma quantidade anormal de ACh nestes locais, o que causa uma reação exagerada dos tecidos musculares, devido a uma elevada atividade dos receptores colinérgicos, causando possíveis efeitos tóxicos (Walker, 2001). Esta reação poderá causar alterações comportamentais, como hiperatividade, além de asfixia e finalmente a morte (Walker, 2001).

O gene que codifica para a acetilcolinesterase do peixe-zebra foi clonado e sequenciado por Bertrand e colaboradores em 2001, revelando que esta enzima é codificada por somente um gene e que sua seqüência de 634 aminoácidos apresenta 62% de similaridade em relação aos mamíferos. Neste estudo, não foi verificada a presença de um gene que codifique a butirilcolinesterase, indicando que possivelmente não há atividade desta enzima no peixe-zebra.

A inibição da atividade da acetilcolinesterase foi observada quando peixes-zebra foram expostos aos agentes tóxicos paration (Roex et al., 2003) e metanol (Rico et al., 2006), enquanto que o etanol promoveu um aumento significativo desta atividade (Rico et al., 2007).

### 1.1.3. Nicotina

A nicotina ( $C_{10}H_{14}N_2$ ) (Figura 1) é um alcalóide que está presente nas folhas do tabaco (*Nicotiana tabacum*), uma planta nativa das Américas. A nicotina, o maior constituinte do tabaco, é o componente responsável pelo desenvolvimento e manutenção da dependência pelo tabaco (Nakajima, 2007). O fumo é o fator de risco que mais aumenta a morbidez e mortalidade nos Estados Unidos e talvez no mundo (Lee, 1993).

A absorção da nicotina se dá pela via pulmonar e oral. É um estimulante leve, que quando consumida nas primeiras vezes provoca tonturas, formigamento e alterações discretas do humor e do estado de vigília. O hábito de fumar é explicado, em grande parte, através da dependência dos efeitos da nicotina. A nicotina afeta o comportamento e o desempenho e isto claramente, é a fonte para a dependência pelo tabaco (Benowitz, 1992). Fumantes relatam que o ato de fumar os desperta quando estão sonolentos e os acalma quando estão tensos, o que, pelo menos em parte, explica seu grande potencial como droga de abuso (Francischi et al., 2005).

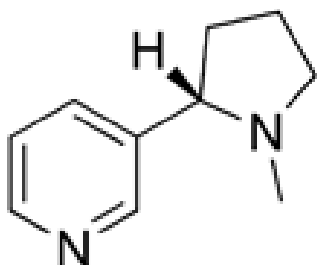


Figura 1: Estrutura química da nicotina (agonista colinérgico)

A nicotina atua nos receptores colinérgicos nicotínicos (Figura 2) centrais e periféricos que são ativados e depois inibidos pela própria droga. Estes receptores receberam esta denominação, pois a nicotina provoca o efeito de contração do músculo esquelético de cobaia (Francischi et al., 2005). Os receptores colinérgicos nicotínicos estão localizados em várias regiões do cérebro, no hipocampo e córtex cerebral, que estão

envolvidas nos aspectos cognitivos incluindo atenção, aprendizado e memória (Levin e Simon, 1998; White e Levin, 1999; Levin e Rezvani, 2000; Papke et al., 2000). A nicotina estimula a liberação de vários neurotransmissores incluindo a acetilcolina (que é reconhecida pelos receptores colinérgicos nicotínicos), dopamina, norepinefrina, serotonina e glutamato (Levin e Simon, 1998).

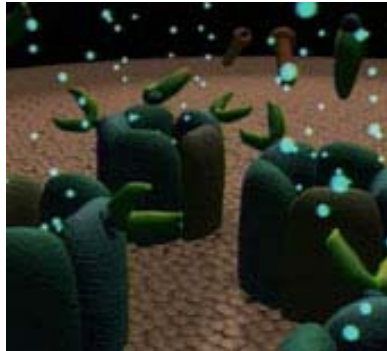


Figura 2. Os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) na superfície celular (representados como estruturas verdes fixas) recebem a nicotina (partículas verdes em forma de bumerangue) e íons de sódio (pontos azuis) (Chen et al., 2007).

#### **1.1.4 Nicotina e alterações comportamentais em peixe-zebra**

Efeitos tóxicos e farmacológicos causados pela exposição à nicotina têm sido freqüentemente relatados na literatura. Por outro lado, tanto a nicotina quanto outros agonistas nicotínicos em doses baixas têm demonstrado efeitos benéficos potenciais que incluem uma melhora de déficit cognitivo, que podem contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos para desordens cognitivas como a doença de Alzheimer (Levin e Chen, 2004).

Vários estudos têm demonstrado que a nicotina melhora as funções cognitivas em ratos, camundongos, macacos e humanos (Buccafusco e Jackson, 1991; Levin e Simon, 1998). Mais recentemente, alguns estudos têm demonstrado que a nicotina foi capaz de melhorar a memória (Levin e Chen, 2004; Levin et al., 2006), além de apresentar efeitos ansiolíticos em peixe-zebra (Levin et al., 2007).

Considerando que a exposição a nicotina pode causar prejuízo na performance neurocomportamental e afetar o sistema colinérgico no sistema nervoso central (Abou-Donia et al., 2003), em peixe-zebra a nicotina apresenta uma curva dose resposta em formato de U invertido, pelo qual moderadas doses melhoram as funções cognitivas e altas doses não tem efeitos positivos (Levin e Chen, 2004; Eddins et al., 2009), se torna relevante investigar os efeitos da nicotina sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase que hidrolisa o neurotransmissor responsável pelo aprendizado e memória.

## **1.2. OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos de diferentes concentrações da nicotina sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), no SNC do peixe-zebra.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

Verificar o efeito *in vitro*, em doses que variam de 1 a 1000  $\mu\text{M}$  de nicotina, sobre a atividade da AChE em cérebro de peixe-zebra;

Avaliar o efeito *in vivo* da exposição a diferentes concentrações da nicotina (50, 100, 150, 200, 400, 800 mg/l), capazes de alterar aspectos cognitivos, se afetam a atividade da AChE em cérebro de peixe-zebra.

## **2. CAPITULO 2**

### **2.1 MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL**

Artigo submetido à revista científica Nicotine & Tobacco Research

#### **Effects of acute nicotine exposure on acetylcholinesterase activity in Zebrafish (*Danio rerio*) brain**

Vanessa de Matas Soares, Maria Cristina Berta Sant'Anna, Eduardo Pacheco Rico Daniela

Martí Barros, Gabriele Ghisleni, Carla Denise Bonan, Mauricio Reis Bogó



**Effects of acute nicotine exposure on acetylcholinesterase activity in Zebrafish (*Danio rerio*) brain**

Vanessa de Matas Soares<sup>a</sup>, Maria Cristina Berta Sant'Anna<sup>a</sup>, Eduardo Pacheco Rico<sup>b</sup>  
Daniela Martí Barros<sup>c</sup>, Gabriele Ghisleni<sup>d</sup>, Carla Denise Bonan<sup>d,\*</sup>, Mauricio Reis Bogo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália, Km 8 - Campus Carreiros, 96201200 Rio Grande, RS, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

**\*Corresponding authors**

[cbonan@pucrs.br](mailto:cbonan@pucrs.br) (C.D. Bonan) and [mbogo@pucrs.br](mailto:mbogo@pucrs.br) (M.R.Bogo)

Tel.: +55 51 3320-3500/Ext.: 4726

Fax: +55 51 3320-3568

## **Abstract**

**Introduction:** Nicotine is an alkaloid that has a variety of beneficial and toxicological effects on the CNS. This is possible due its dose-effect function seen with many drugs, in which there is a tendency to improve cognitive function at lower doses and impair performance at higher doses. Although the neuromolecular mechanisms for nicotine effects are still incompletely understood, the nicotinic receptors interact with other systems including muscarinic acetylcholine, dopamine and glutamate. Acetylcholine is a classical neurotransmitter that plays several roles at CNS and, after released, it is rapidly removed from the synaptic cleft by acetylcholinesterase (AChE). Zebrafish are being developed as sensitive models for studying the neurobehavioral impact of neurotoxicants as well as pharmacological agents.

**Methods:** Here we tested the *in vitro* and *in vivo* effects of nicotine concentrations that had improved or impaired cognitive functions in zebrafish after acute exposure, on AChE brain activity. AChE activity was expressed as micromole of thiocholine (SCh) released per hour per milligram of protein. Four different experiments were performed and the assays were run in quadruplicate.

**Results:** For *in vitro* studies nicotine was able to decrease AChE activity at 500 (11.02%) and 1000  $\mu\text{M}$  (7.73%). The *in vivo* nicotine acute exposure (3 and 20 min) did not significantly modify AChE activity in zebrafish brain in the doses tested.

**Discussion:** Our results have shown that nicotine exposure was able to inhibit the AChE activity by direct mechanisms and that the acute nicotine exposure did not result in alterations in zebrafish brain AChE activity.

**Keywords:** Acute nicotine treatment; Acetylcholinesterase activity; Zebrafish

## **Introduction**

Nicotine (3-[1-methyl-2-pyrrolidinyl] pyridine) has wide variety of pharmacological and toxicological effects, and its reinforcing effects underlie tobacco use addiction (Benowitz, 1996). Three main effects which seem to prominently underlie cigarette smoking are reward, cognitive enhancement, and anxiolysis (Brandon, 1999). Nicotine and nicotinic agonists have been found to effectively improve cognitive function in a number of species including humans, monkeys, rats, mice, and zebrafish (Buccafusco and Jackson, 1991; Levin and Simon 1998; Levin and Chen, 2004; Levin et al., 2006). Once absorbed, nicotine enters the circulation and distributes rapidly to different tissues including brain. Nicotine is a direct cholinergic agonist at the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) site, resulting in behavioral (Martin and Becker, 1970) and cellular effects (Slotkin, 1999) consistent with cholinergic over-stimulation (Abou-Donia et al., 2003).

Nicotine induces the release of a variety of neurotransmitters, including acetylcholine, dopamine, norepinephrine, serotonin, and glutamate (Levin and Simon 1998; McKay et al., 2007). Acetylcholine is a classical neurotransmitter that plays several roles at CNS. After released, acetylcholine is rapidly removed from the synaptic cleft by acetylcholinesterase, which belongs to the family of type B carboxylesterases and cleaves acetylcholine into choline and acetate (Cousin et al., 2005).

The zebrafish has been used extensively for the study of the molecular basis of the developmental biology. This species offers many advantages to the study of organ and tissue development that are not provided by other model systems (Dodd et al., 2000). Recently, zebrafish was recognized as a reliable model for studies of behavior, neural circuitry, and neural disease (Guo, 2004), for investigating chemical toxicity (Hill et al.,

2005) and human diseases (Dodd et al., 2000) as well as a pharmacological tool (Goldsmith, 2004).

The cholinergic system has been also shown to be widely distributed in the zebrafish brain, according to the results of an immunocytochemical study on choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholine esterase (AChE) (Park et al., 2008). Zebrafish nicotinic receptors show a high degree of similarity to those in mammals (Zirger et al., 2003). Moreover, zebrafish presents a unique situation among vertebrates, because AChE is the only ACh-hydrolyzing enzyme in this organism (Behra et al., 2003).

Considering that: (i) exposure of nicotine may impair neurobehavioral performance and affect the CNS cholinergic pathways (Abou-Donia et al., 2003); (ii) in zebrafish, nicotine presented an inverted U-shaped dose-response curve with moderate doses improving cognitive function and higher doses having less of a positive effect (Levin and Chen, 2004; Eddins et al., 2009), and (iii) zebrafish cholinergic system was already described (Zirger et al., 2003; Behra et al., 2003), the aim of this study was to investigate the *in vitro* and *in vivo* acute effects of nicotine on acetylcholinesterase activity in zebrafish brain.

## **Material and methods**

### *Animals*

Adult zebrafish of both sexes were obtained from commercial supplier (Delphis, RS, Brazil) and acclimated for at least 2 weeks in a 50 l aquarium. The fish were kept on a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 am) at a temperature of  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . They were used according to the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals, being healthy and free of any signs of disease. The Ethics Committee of

Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) approved the protocol under the number 08/00016 – CEUA.

### *Chemicals*

Nicotine ditartrate, Trizma Base, EDTA, EGTA, sodium citrate, Coomassie Blue G, bovine serum albumin, acetylthiocholine, and 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) were purchased from Sigma (St. Louis, USA).

### *In vitro and in vivo treatments*

The nicotine doses and time of treatment for *in vitro* and *in vivo* assays were chosen based on previous studies with zebrafish (Levin and Chen, 2004). For *in vitro* assay, the samples (at 10 µg protein concentration) were directly added to the reaction medium containing nicotine at final concentrations in the range of 1, 10, 100, 500, and 1000 µM, pre-incubated during 10 min at 25° and maintained throughout the enzyme assays. In the *in vivo* treatments, nicotine (50, 100, 150, 200, 400, and 800 mg/l) was administered by placing the fish in a beaker containing 250 ml of water and after 3 and 20 min in the dosing beaker the zebrafish brain was removed for determination of AChE activity.

### *Determination of AChE activity*

The brains were homogenized on ice in 60 volumes (v/w) of Tris-citrate buffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 7.4, with citric acid) in a motor driven Teflon-glass homogenizer. The rate of acetylthiocholine hydrolysis (0.8 mM) was determined in a final volume of 2 ml with 100 mM phosphate buffer, pH 7.5, and 1.0 mM DTNB using a method previously described (Ellman et al., 1961). The reaction assay began with the substrate addition and the rate of acetylthiocholine hydrolysis was monitored by the

formation of thiolate dianion of DTNB at 412 nm for 2–3 min (30s intervals). Controls without the homogenate preparation were performed in order to determine the non-enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine. The linearity of absorbance related to time and protein concentration was previously determined. AChE activity was expressed as micromole of thiocholine (SCh) released per hour per milligram of protein. Four different experiments were performed and the assays were run in quadruplicate.

#### *Protein determination*

Protein was measured by the Coomassie Blue method (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as a standard.

#### *Statistical analysis*

Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc test, and expressed as means  $\pm$  S.D. Differences were considered significant for  $P < 0.05$ .

### **Results**

In order to verify if nicotine exposure could modify the AChE activity by direct mechanisms, we have performed *in vitro* assays with concentrations varying from 1 to 1000  $\mu$ M. When added directly to reaction medium, nicotine promoted a significant inhibition of AChE hydrolysis (11.02 % and 7.73 %) at 500 and 1000  $\mu$ M respectively, comparing to the control group (Fig.1).

The acute nicotine exposure at concentrations that had improved (50 to 100mg/l during 3 min) and impaired cognitive functions (200 to 800mg/l during 3 min) (Levin and Chen, 2004) was evaluated on AChE activity in zebrafish brain. There were no significant

changes on AChE activity in zebrafish brain in all nicotine concentrations tested for *in vivo* treatments (Fig. 2). It is possible to speculate that 3 min of nicotine exposure could be not time enough to promote any significant change on AChE activity. For this reason, a second acute treatment (20 min of nicotine exposure) was performed. No significant changes on AChE activity were also observed (Fig. 2).

## **Discussion**

The present study was carried out to evaluate the possible effects of nicotine exposure *in vitro* and *in vivo* at several concentrations on AChE activity, since that nicotine at different doses presented distinct modulation of behavioral parameters (Levin and Chen, 2004). Studies have show that nicotine acting initially on nAChRs can increase arousal, heighten attention, produce states of euphoria, decrease fatigue, decrease anxiety, and influence a number of cognitive functions (Rose and Levin, 1991, Levin, 1992; Everitt and Robbins, 1997; Adler et al., 1999).

Larsson et al. (1980) reported an inhibition of AChE activity in brain preparations of rats chronically exposure at high doses of nicotine. In a different fashion, more recently, Abou-Donia et al. (2003) have shown that low doses of nicotine chronically administered in rats lead to the increased AChE activity. However, until the present moment, there is no report concerning the *in vitro* or acute *in vivo* effects of nicotine on AChE activity. In the present work, we showed a first evidence of the action of nicotine on the AChE in zebrafish brain.

Here, we demonstrated that nicotine promotes a decrease in AChE activity just at high doses (500 and 1000 $\mu$ M) when directly added in the enzyme assays. We can suggest that this effect can be probably a direct action of nicotine on the AChE, since this enzyme is anchored to the outer surface of the plasma membrane by a covalently attached glycosyl-

phosphatidylinositol (GPI) structure, and it is possible that changes in membrane bilayer environment promoted by the interaction with nicotine could be able to promote the inhibitory effect observed on AChE activity. Moreover, despite the compelling evidence that nicotine is neuroprotective, it is clear that nicotine can be toxic under some circumstances and its toxicity still depends on dose, development stage and regimen of administration (Picciotto and Zoli, 2008). Therefore, a full understanding of the molecular and cellular effects of nicotine is essential to clarify the mechanisms of action involved in neuroprotection and toxicity.

In contrast to previous study, where the acute treatment with low nicotine doses improved memory performance whereas higher doses showed a diminished memory performance, our findings showed the same nicotine concentrations and time of exposure, used by Levin and Chen (2004), did not cause any changes in AChE activity. These findings suggest that modifications on AChE activity probably are not related to distinct nicotine-induced behavioral patterns described previously (Levin and Chen, 2004).

Moreover, is important emphasize that studies conducted with nicotine chronic treatments reported distinct effects on AChE activity when different nicotine concentrations were administered in rats (Larsson et al., 1980; Abou-Donia et al., 2003). Now, it is clear that with continued use, nicotine builds up to a low steady-state concentration that causes significant nAChR desensitization and (over time) longer-term inactivation. There is evidence that nicotinic receptor turnover decrease following inactivation, leading to an increased number of nAChRs, and an enhancing sensibility to cholinergic agonists (Dania and Heinemann, 1996). In this way, we can suggest that possibly a chronic assay with nicotine in zebrafish can promote a similar effect reported previously to mammals.

## **Acknowledgments**



This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and by the FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” 01.06.0842-00. E.P.R. was recipient of fellowship from CNPq. M.C.B.S. was recipient of fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

### **Competing interests**

The authors have no competing interests.

## References

- Abou-Donia MB, Abdel-Rehman AA, Goldstein LB, Dechkovskaia AM, Shah, D.U., Bullman SL, Khan WA., 2003. Sensorimotor deficits and increase brain nicotinic acetylcholine receptors following to chlorpyrifos and/or nicotine in rats. *Archives of Toxicology* (77): 452–458.
- Adler, L E, Freedman, R., Ross, R. G, Olincy, A, Waldo, M.C., 1999. Elementary phenotypes in the neurobiological and genetic study of schizophrenia. *Biological Psychiatry* (46): 8-18.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J.L., Biemann, D., Chatonnet, A., Strähle, U., 2003. The use of zebrafish mutants to identify secondary target effects of acetylcholine esterase inhibitors. *Toxicological Science* (77): 325-333.
- Benowitz, N.L., 1996. Pharmacology of nicotine: Addiction and therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (36): 597-613.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* (72): 218-254.
- Brandon, T.H., 1999. Expectancies for tobacco smoking. In: Kirsh I, editor. *How expectancies shape experience*. American Psychological Association: 263-299.
- Buccafusco, J.J., Jackson W.J., 1991. Beneficial effects of nicotine administered prior to a delayed matching-to-sample task in young and age monkeys. *Neurobiology of Aging* (12): 233-238.
- Cousin, X., Strahle U., Chatonnet, A., 2005. Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases. Lesson from mutant animal models. *Bioassays* (27): 189-200.
- Dani, A., J., Heinemann, S., 1996. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron*. (16): 905-908.

- Dood, A, Curtis P.M, Williams L.C, Love D.R. 2000. Zebrafish:bridging the gap between development and disease. *Human Molecular Genetics* (16): 2443-2449.
- 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*. (Epub ahead of print).
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andrés, J.V., Feartherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* (7): 88-95.
- Everitt, B.J., Robbins, T.W., 1997. Central cholinergic system and cognition. *Annual Review of Psychology* (48): 649-684.
- Goldsmith, P., 2004. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology* (4): 504-512.
- Guo, S., 2004. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes, Brain and Behavior* (3): 63-74.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E, 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 86(1): 6-19.
- Larson, P.A, Dahlstrom, A, Heiwall, P.O, Booj, S., 1980. The effect of chronic nicotine and withdrawal on intra-axonal transport of acetylcholine and related enzymes in sciatic nerve of the rat. *Journal of Neural Transmission* (47): 243-251.
- Levin, E.D, 1992. Nicotinic system and cognitive function. *Psychopharmacology* (108): 417-431.
- Levin, E.D, Simon, B.B., 1998. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology* (138): 217-230.

- Levin, E.D, Chen, E., 2004. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish *Neurotoxicology and Teratology* (26): 731-735.
- Levin, E.D, Limpuangthip, J., Rachankonda, T., Peterson, M., 2006. Timing of nicotine in effects on learning in zebrafish. *Psychopharmacology* (184): 547-552.
- Martin, J.C., Becker, R.F., 1970. The effects of nicotine administration in utero upon activity in the rat. *Psychological Science* (19): 59-60.
- McKay, E.B., Placzek, A.N., 2007. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* (8): 1120-1133.
- Park, E., Lee, Y., Kim, Y, Lee, C., 2008. Cholinergic modulation of neural activity in the telencephalon of the zebrafish. *Neuroscience Letters* (439):79-83.
- Picciotto, M.R., Zoli, M., 2008. Neuroprotection via nAChRs: the role of nAChRs in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease. *Frontiers in Bioscience* (13), 492-504.
- Rose J.E., Levin, E.D, 1991. Inter-relationships between conditioned and primary reinforcement in the maintenance of cigarette smoking. *British Journal of Addiction* (86): 605-609.
- Slotkin, T.A., 1999. Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environmental Health Perspectives* (107): 71-80.
- Zirger J.M., Beattie C.E., McKay D.B., Boyd R.T., 2003. Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Gene Expression Patterns* (3): 747-754.

## Legends

**Fig. 1** - *In vitro* effects of varying concentrations of nicotine (1, 10, 100, 500 or 1000  $\mu\text{M}$ ) on AChE activity in zebrafish brain. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. of at least five different experiments. The AChE control activity was  $22.6 \pm 2.4$   $\mu\text{mol}$  of thiocholine released per hour per milligram of protein. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey multiple range test.  $*p < 0.0001$  denotes a significant difference from the control group.

**Fig. 2** - *In vivo* effects of acute treatment (3 or 20 minutes) with nicotine (12.5 – 500 mg/l) on AChE activity in zebrafish brain. White bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. of at least seven different experiments. The AChE control activity was  $35.45 \pm 2.3$  (3 min) and  $37.24 \pm 1.6$  (20 min)  $\mu\text{mol}$  of thiocholine released per hour per milligram of protein. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by a Tukey multiple range test, considering a  $p < 0.05$ .

**Figure 1**

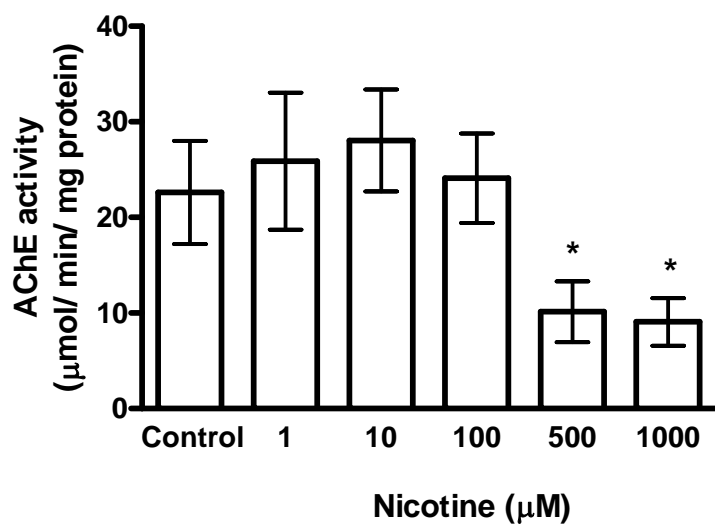
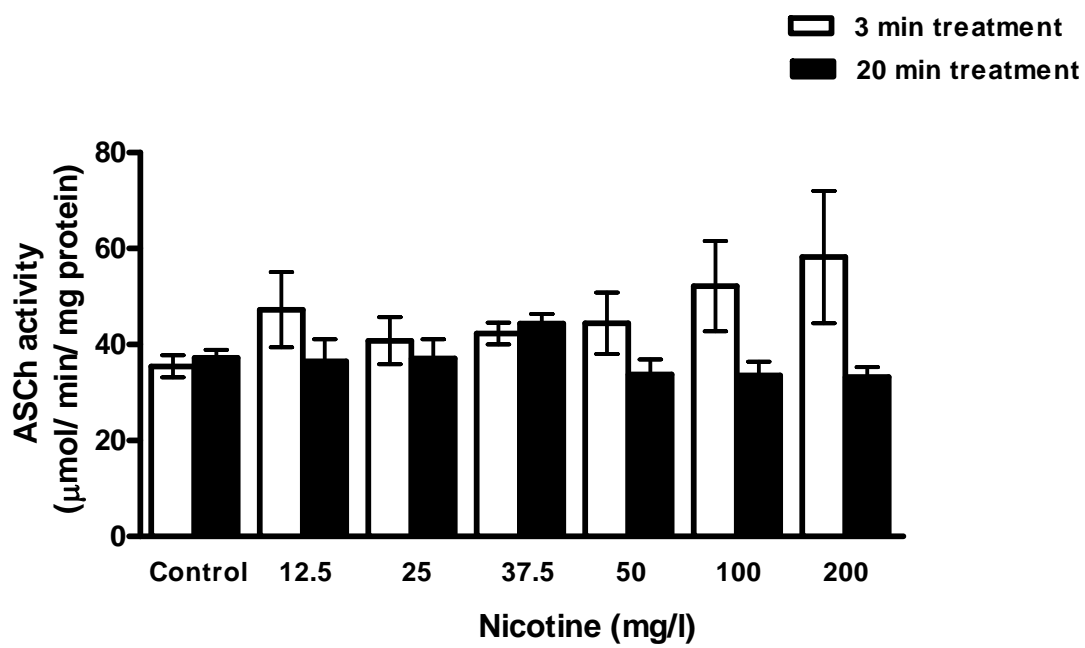


Figure 2



### 3. CAPITULO 3

#### 3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A nicotina é um alcalóide que exerce uma variedade de efeitos benéficos e toxicológicos no SNC (Levin e Chen, 2004). Tanto a nicotina quanto os agonistas nicotínicos efetivamente melhoraram as funções cognitivas em muitas espécies incluindo humanos, macacos, ratos, camundongos, e o peixe-zebra (Buccafuso e Jackson, 1991; Levin e Simon, 1998; Levin e Chen, 2004; Levin et al., 2006). Uma vez absorvida, a nicotina entra na circulação e é distribuída rapidamente para vários tecidos incluindo o cérebro (Abou-Donia et al., 2003).

Levin e colaboradores (2007) demonstraram que a nicotina administrada em baixas concentrações diminui a ansiedade em peixe-zebra. O teste foi baseado no comportamento natural de permanecer no fundo que caracteriza um mecanismo de fuga e defesa contra predadores apresentado pelo peixe-zebra. O grupo tratado com baixas doses de nicotina (três minutos) permanece menos tempo no fundo, explorando mais rapidamente o topo do aquário evidenciando um efeito ansiolítico da nicotina.

Com o objetivo de contribuir para o melhor entendimento da ação da nicotina no SNC, foi avaliado o efeito da exposição a diferentes concentrações de nicotina sobre a atividade da acetilcolinesterase em cérebro de peixe-zebra.

Os resultados demonstraram que somente as maiores concentrações de nicotina alteraram a atividade da AChE no estudo *in vitro*, promovendo um decréscimo significativo na atividade da enzima quando comparada ao grupo controle. Uma vez que a AChE é uma enzima que se encontra ancorada na superfície da membrana plasmática, é possível sugerir que mudanças na bicamada lipídica promovida pela interação com a



nicotina poderia explicar, pelo menos em parte, o efeito inibitório observado na atividade da AChE.

Não houve alteração significativa na atividade da AChE, após três e 20 minutos de exposição dos peixes a droga, embora nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/l da exposição durante 20 minutos, parece haver uma tendência de inibição. Estes resultados sugerem que as alterações comportamentais induzidas pela exposição a diferentes concentrações de nicotina não estão relacionadas a modificações na atividade da AChE em cérebros de peixes-zebra.

Por outro lado, a exposição continuada (tratamento crônico) as mesmas concentrações de nicotina poderia levar a uma modificação na atividade da AChE em cérebro de peixe-zebra. Foi mostrado previamente que a atividade da AChE em cérebro de ratos foi modulada por exposição crônica a doses altas (Larsson et al., 1980) causando inibição, e doses baixas de nicotina (Abou-Donia et al., 2003), causando aumento da atividade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bachman, E.S., Berger-Sweeney, J., Coyle, J.T., Hohmann, C.F. Developmental regulation of adult cortical morphology and behavior: an animal model for mental retardation. *Int J. Dev Neurosci.*(12): 239-253, 1994.
- Barbazuk, W.B., Korf, I., Kadavi, C.; Heyen, J., Tate, S.; Wun, E., Bedell, A., McPherson, J.D.; Johnson, S. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* (10): 1351-1358, 2000.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J.L., Biemann, D., Chatonnet, A., Strähle, U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat Neurosci.* 5(2): 111-118, 2002.
- Benowitz, Nl. Cigarette smoking and nicotine addiction. *Med Clin North Am.* 76(2): 415-437, 1992.
- Berger, F., Gage, F.H., Vijayaraghavan, S. Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci.* (18): 6871-6881, 1998.
- Bertrand, C., Chatonnet, A.; Takke, C., Yan, Y.; Postlethwait, J., Toutant, J.P., Cousin, X. Zebrafish acetylcholinesterase is encoded by a single gene localized on linkage group 7. *J Biol Chem.* 276(1): 464-474, 2001.
- Boehmler, W., Obrecht-Pflumio S. Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev Dyn.* (230): 481-493, 2004.
- Buccafusco, J.J., Jackson W.J. Beneficial effects of nicotine administered prior to a delayed matching-to-sample task in young and age monkeys. *Neurobiol Aging* (12): 233-238, 1991.
- Carvan, M.J.<sup>3rd</sup>, Loucks, E, Weber, D.N., Williams, F.E. Ethanol effects on developing zebrafish : neurobehavior and skeletal morphogenesis. *Neurotoxicol Tetratol.* 26; (6): 757-768, 2004
- Caulfield, M.P., Birdsall, N.J.M. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* (50): 279-290, 1998.
- Chan, J., Quik, M. A role for the neuronal nicotinic  $\alpha$ -bungarotoxin receptor in neurite outgrowth in PC12 cells. *Neurosci.* (56): 441-451, 1993.
- Chen, L, Dellisanti, C.D., Yao Y., Stroud C.J., Wang Z.Z. Crystal structure of the extracellular domain of nAChR $\alpha$ 1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94Å resolution. *Nature Neurosci.* (10): 953-962, 2007.
- Chen, W.Y, John, J.A.C, Lin, C.H., Lin, H.F. Wu, S.C, Chang, C.Y. Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish. *Aquat Toxicol.* (69): 215-227, 2004.

- Clemente, D., Porteros, A., Weruaga, E., Alonso, J.R., Arenzana, F.J., Aijon, J., Arevalo, R. Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: histochemical and immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol.* (474): 75-107, 2004.
- Dani, A.J., De Biasi, M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem and Behav.* (70): 439-446, 2001.
- Darland, T., Dowling, J.E. Behavior screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98 (20):11691-11696, 2001.
- Edwards, J.G, Michel, W.C. Odor-Stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 454 (3): 294-309, 2002.
- Francischi, J.N, Castro, M.S, Lopes, M.T, Maia, R.M. A farmacologia em nossa vida. Belo Horizonte: *Editores UFMG*, p. 83-86, 2005.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S. Rosenthal, A. Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav.* (67): 773-782, 2000.
- Goldsmith, P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol.* (4): 504-512, 2004.
- Gotti, C., Clementi, F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* (74): 363-396, 2004.
- Guo, S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.* 3(2), 63-74, 2004.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 86(1): 6-19, 2005.
- Hohmann, C.F., Brooks, A.R., Coyle, J.T. Neonatal lesions of the basal forebrain cholinergic neurons result in abnormal cortical development. *Dev. Brain Res.* (42): 253-264, 1988.
- Hohmann, C.F., Wilson, L., Coyle, J.T. Efferent and afferent connections of mouse sensory-motor cortex following cholinergic differentiation at birth. *Cereb Corte.* (1) 1158-1172, 1991.
- Hory-Lee, F., Frank, E. The nicotinic blocking agents d-tubocurarine and alfa-bungarotoxin save motoneurons from naturally occurring death in the absence of neuromuscular blockade. *J Neurosci.* (15): 6453-6460, 1995.
- Kaslin, J, Panula, P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol.* 440(4): 342-77, 2001.
- Kim, Y.J, Nam, R.H, Yoo, Y.M, Lee, C.J. Identification and functional evidence of gabaergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett.* (355): 29-32, 2004.

- Kucenas, S, Li, Z, Cox, J.A, Egan, T.M, Voigt, M.M. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neurosci* (121): 935–945, 2003.
- Lee, E.W, D’Alonzo, G.E. Cigarette smoking, nicotine addiction, and its pharmacologic treatment. *Arch Intern Med.* 153(1): 34-483, 1993.
- Levin, E.D, Simon, B.B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animal. *Psychopharm.* (138): 217-230, 1998.
- Levin, E.D, Rezvani, A.H. Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. *Eur J Pharmacol.* (393): 141-146, 2000.
- Levin, E.D, Chen, E. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* (26): 731-735, 2004.
- Levin, E.D, Bencan, Z., Cerutti, D.T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav.* (90): 54-58, 2007.
- Lipton, S.A., Frosch, M.P., Phillips, M.D., Tauck, D.L., Aizenman, E. Nicotinic antagonists enhance process outgrowth by rat retinal ganglion cells in culture. (239): 1293-1296, 1988.
- Mc Kay, B.E., Placzek, A.N., Dani, J.A. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol.* 74(8) : 1120-1133, 2007.
- Matta, S.G., Balfour, N.L., R.T., Zirger, J.M., Buccafusco, J.J., Caggiula, Craig, C.R., Schafer, W.R., Collins, A.C., Grady, S.R., Marks, M.J., Wehner, J.M Damaj, M.I., Gardiner, P.S., Herberlein, U., Rothenfluh, A., Leonard, S.S., Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology* (190): 269-319, 2007.
- Nakajima, M. Smoking behavior and related cancers: The role of CYP2A6 polymorphisms. *Curr Opin Mol Ther.* 9(6): 538-544, 2007
- Ninkovic, J., Bally-Cuif, L. The zebrafish as model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods* (39):262-274, 2006.
- Papke, R.L., Meyer, E., Nutter, T., Uteshev, V.V. Alpha 7 receptor-selective agonist and modes of alpha7 receptor activation. *Eur J Pharmacol.* (393):179-195, 2000.
- Pugh, P.C., Berg, D.K. Neuronal acetylcholine receptors that bind alfa-bungarotoxin mediate neurite retraction in calcium-dependent manner. *J Neurosci.* (14):889-896, 1994.
- Pugh, P.C., Margiotta, J.F. Nicotinic acetylcholine receptors agonists promote survival and reduce apoptosis of chick ciliary ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci.* (15): 113-122, 2000.
- Rico, E.P., Senger, M.R., Fauth, M.G., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci.* (73): 2071-2082, 2003.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Senger, M.R., Arizi, M.D., Bernardi, G.F., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicol Teratol.* 28(4): 489-496, 2006.

- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol Lett.* 174(1-3): 25-30, 2007.
- Rink, E., Guo, S. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neurosci.* 27(1):147-54, 2004.
- Roex, E.W.M.; Keijzers, R.; Gestel, C.A.M. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquat Toxicol.* 64(4): 451-460, 2003.
- Sarter, M., Parikh, V. Choline Transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci.* (6): 49-56, 2005.
- Schuller, H.M., Clarke, P.B.S., Quik, M., Adlkofer, F., Thurau, K. (Eds). Mechanisms of nicotine stimulated cell proliferation in normal and neoplastic neuroendocrine lung cells, Effects of Nicotine on Biological Systems II, *Birkhauser Verlag, Basel*, pp 151-158, 1995.
- Senger, M.R., Rico E.P., Dias, R.D., Bogo, M.R. and Bonan, C.D. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 139 (2): 203-7, 2004.
- Senger, M.R., Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Arizi, M.D., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D. In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicol in vitro.* (20): 954-958, 2006.
- Slotkin, T.A. Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Env Health Persp.* (107): 71-80, 1999.
- Soreq, H., Seidman, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci.* (2): 294-302, 2001.
- Svoboda, K.R., Vijayaraghavan, S., Tanguay, R.L. Nicotinic receptors mediate changes in spinal motoneuron development and axonal pathfinding in embryonic zebrafish exposed to nicotine. *J Neurosci.* (22): 10731-10741, 2002.
- Tinsley, M.R., Quinn, J.J., Fanselow, M.S. The role of muscarinic and nicotinic cholinergic neurotransmission in aversive conditioning: comparing pavlovian fear conditioning and inhibitory avoidance. *Learn Mem.* (11): 35-42, 2004.
- Turnell, E.R., Mann, K.D., Rosenthal, G.G., Gerlach, G. Mate choice in zebrafish (*Danio rerio*) analyzed with video-stimulus techniques. *Biol Bull.* 205 (2): 225-226, 2003.
- Vascotto, S.G., Beckham, Y., Kelly, G.M. The zebrafish's swim to fame an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol* (75): 479-485.
- Uchiyama, T., Chess-Williams, R. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *J Smooth Muscle Res.* 40 (6): 237-247, 2004.

- Walker, C.H. Organophosphorous and carbamate insecticides. Organic Pollutants. An ecotoxicological Perspective. *Taylor & Francis* N Y, USA, 2001.
- White, H.K., Levin E.D. Four week nicotine skin patch treatment effects on cognitive performance in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology* (143): 158-165, 1999.
- Woods, I.G., Kelly, P.D., Chu, F., Ngo-azelett, P., Yan, Y.L., H.Postlethwait, J.H., Talbot, W.S. A comparative map of the zebrafish genome. *Genome Res.*10 (12): 1903-1914, 2000.
- Wright, D., Rimmer, L.B., Pritchard, V.L., Krause, J., Butlin, R.K. Inter and intra-population variation in shoaling and boldness in the zebrafish (*Danio rerio*). *Naturwissenschaften* 90;(8):374-377, 2003.
- Zheng, J.Q., Felder, M., Connor, J.A., Poo, M.M. Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* (368):140-144, 1994.
- Zirger, J.M., Beattie, C.E., McKay, D.B., Boyd, R.T. Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Gene Expr.Patterns.* (3): 747-754, 2003.

## ANEXO I

De: onbehalf@scholarone.com em nome de jzbrands@earthlink.net  
Enviado em: Monday, January 26, 2009 10:58 AM  
Para: Mauricio Reis Bogo  
Assunto: Nicotine & Tobacco Research - Manuscript ID NTR-2009-028

26-Jan-2009

Dear Dr. Bogo,

Your manuscript entitled "Effects of acute nicotine exposure on acetylcholinesterase activity in Zebrafish (*Danio rerio*) brain" has been successfully submitted online and is presently being evaluated for consideration for publication in Nicotine & Tobacco Research.

If you have followed the author guidelines in preparing and submitting your manuscript, it will be forwarded to the editors for evaluation. If your manuscript does not comply with the guidelines, you will be asked to bring it into compliance before the manuscript is considered for review.

Your manuscript ID is NTR-2009-028.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/ntr> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/ntr>.

Thank you for submitting your manuscript to Nicotine & Tobacco Research.

Sincerely,  
Nicotine & Tobacco Research Editorial Office