

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliação do desenvolvimento do sistema nervoso central de  
camundongos Balb/c expostos à fumaça do cigarro no início do período  
pós-natal

Larissa Helena Lobo Torres Pacheco

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador: Profa. Dra. Tania Marcourakis  
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto G. de Britto

São Paulo  
2013

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliação do desenvolvimento do sistema nervoso central de  
camundongos Balb/c expostos à fumaça do cigarro no início do período  
pós-natal

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.  
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Larissa Helena Lobo Torres Pacheco

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador: Profa. Dra. Tania Marcourakis  
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto G. de Britto

São Paulo  
2013

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

T693a Torres-Pacheco, Larissa Helena Lobo  
Avaliação do desenvolvimento do sistema nervoso central de camundongos Balb/c expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal / Larissa Helena Lobo Torres Pacheco. -- São Paulo, 2013.

141p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Marcourakis, Tania

Co-orientador: Britto, Luiz Roberto Giorgetti de

1. Toxicologia experimental 2. Tabaco : Toxicologia I. T. II. Marcourakis, Tania, orientador III. Britto, Luiz Roberto Giorgetti de, co-orientador.

615.90028 CDD

Larissa Helena Lobo Torres Pacheco

Avaliação do desenvolvimento do sistema nervoso central de  
camundongos BALB/c expostos à fumaça do cigarro no início do período  
pós-natal

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Tania Marcourakis  
orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

---

3º. examinador

---

4º. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de 2013.

À minha mãe Mônica, ao meu pai Pedro (saudades), ao meu irmão Pedro Henrique, aos meus avós José Américo e Mariliza, João e Luzia (saudades), aos meus tios e primos, pelo amor incondicional, pelo carinho, pela estrutura familiar que me permitiu não apenas sonhar, mas ter confiança para enfrentar todos os desafios.

Ao meu marido Maurílio,

Impossível expressar em palavras tamanha gratidão.

Certa vez, citando Raul Seixas você disse: "Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto é realidade". Mas isso só acontece pelo amor, companheirismo, cumplicidade, amizade e dedicação no dia a dia dessa jornada. Sem você esse sonho não seria realidade.

À Tania,

Há alguns anos, quando ingressei na Pós-Graduação, eu sabia exatamente o que queria e hoje me sinto preparada para qualquer situação.

Durante esse período fui desafiada e provocada em vários momentos, mas com seu apoio, compreensão e confiança, consegui transformar ideais em realizações.

Com você, aprendi o sentido do que é ser mestre!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto, pelas valiosas ideias, apoio, disponibilidade e pelo exemplo profissional.

À Profa. Dra. Rosana Camarini, pela colaboração nos ensaios comportamentais e pela importante contribuição na discussão deste trabalho.

Ao Raphael Caio Tamborelli Garcia, por compartilhar comigo toda a trajetória da pós-graduação com companheirismo e amizade ao longo de tantos anos.

À Lívia, Ana Carolina e Wallace, pela amizade e ajuda constante. Com vocês, tudo fica mais fácil!

À Anne, Priscila e Natalia, pela dedicação e carinho com que me ajudaram a conduzir este trabalho.

À Raquel Annoni, pela disponibilidade e ajuda em diversos experimentos, mas principalmente pelo carinho e amizade.

Aos meus amigos Cecília, Natalia Lopes, Michele, André Nakasato, André Rueda, Cristina, Priscila, Mariana, Karina, Carine, Ana, Isabel, Zeca, Adriana, Eric, André Ribeiro, Tiago, Sarah, Bia e Luma pelo carinho, amizade e pelos bons momentos entre um café e outro.

Ao Adilson da Silva Alves, pela disponibilidade e por toda ajuda nos ensaios de imuno-histoquímica.

À Profa Dra Thais Mauad, pela valiosa colaboração ao disponibilizar os animais para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Maurício Yonamine, pela ajuda nos ensaios de nicotina e cotinina.

Ao Ângelo, pela amizade, carinho e generosidade.

À Samantha, pelo carinho e ajuda em tantos momentos.

À Dona Luzia e Nancy pela colaboração e carinho.

À Aline Arruda, pela ajuda em momentos tão complicados.

À UNIFAL/MG e a Profa. Dra. Lucia Helena S. Ávila Terra, que representam o início da minha trajetória profissional.

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.



## Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com:

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: Documento eletrônico e impresso. Parte I (ABNT)**. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Eliana Maria Garcia, Maria Alice de França Rangel Rebello, Maria Aparecida Bezerra Ayello, Maria José de Jesus Carvalho, Maria Marta Nascimento, Rosana Alvarez Paschoalino, Suely Campos Cardoso, Valéria de Vilhena Lombardi. 2. ed. rev. ampl. 102 p. (Cadernos de Estudos; 9). São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, 2009.

## RESUMO

TORRES-PACHECO, L.H.L. **Avaliação do desenvolvimento do sistema nervoso central de camundongos BALB/c expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal.** 2013. 141 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Diversos estudos relatam os efeitos da exposição à nicotina nos períodos pré e pós-natal, contudo, pouco se sabe a respeito dos efeitos da fumaça do cigarro na cascata de eventos que caracteriza o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi esclarecer se a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal induz prejuízo ao desenvolvimento do SNC na infância, e as possíveis consequências na adolescência e na fase adulta. Camundongos BALB/c foram expostos a uma mistura de fumaça central e lateral do cigarro referência 3R4F (Universidade de Kentucky, EUA), desde o 3º dia de vida pós-natal (P) até P14 por duas horas diárias. Nossos resultados indicam que a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal induz prejuízo ao processo de aprendizado e memória e aumento na ansiedade em todas as idades avaliadas, além de induzir diminuição da atividade locomotora na infância e na adolescência. Ainda, observamos diminuição dos níveis de BDNF e das proteínas sinápticas sinapsina e sinaptofisina no hipocampo, cerebelo, córtex pré-frontal e estriado. A fumaça do cigarro também induz diminuição na porcentagem de fibras mielinizadas no nervo óptico e aumento da proteína básica de mielina (PBM) no cerebelo na infância, além de diminuição da PBM no telencéfalo e tronco encefálico na adolescência e no cerebelo na fase adulta. Nossos resultados sugerem que a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal causa prejuízo ao desenvolvimento do SNC, sendo que não há reversão dos efeitos observados no aprendizado e memória ou mesmo nos níveis de proteína pré-sináptica na adolescência e na fase adulta.

Palavras-chave: Fumaça do cigarro, Desenvolvimento do SNC, Sinaptogênese, Mielinização.

## ABSTRACT

TORRES-PACHECO, L.H.L. **Evaluation of the brain development in BALB/c mice exposed to environmental tobacco smoke in the early postnatal period.** 2013. 141 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Several studies show the effects of nicotine exposure during pre- and postnatal period. However, little is known about the effects of environmental tobacco smoke (ETS) in the cascade of events that characterizes the brain development. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of ETS in early brain development. BALB/c mice were exposed to a mixture of mainstream and sidestream of tobacco smoke of reference cigarettes 3R4F (University of Kentucky, EUA) from the 3rd (P3) to the 14th (P14) day of life, during 2h/day. Our results showed that ETS induced impairment in learning and memory and increased anxiety in all the ages evaluated. In addition, there was a decrease in locomotor activity during childhood and adolescence. ETS also induced impairment in synaptic transmission, by a decrease in synapsin, synaptophysin and BDNF in hippocampus, cerebellum and prefrontal cortex as compared to the control group. The percentage of myelinated fibers in the optic nerve in childhood and in myelin basic protein (MBP) in the telencephalon and brainstem were lower in adolescents mice exposed to ETS when compared to the control group. In cerebellum, there was an increase in MBP in infants and a decrease in adults compared to the control group. Taken all together, our results suggest that the exposure to ETS in the early postnatal period induces impairment to the brain development. It is noteworthy that the effects on learning and memory or even in the presynaptic protein levels were not reversed in adolescence and adulthood.

Keywords: Environmental tobacco smoke, Brain development, Synaptogenesis, Myelination.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVC	Acidente vascular cerebral
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CE	Cerebelo
CG	Cromatografia em fase gasosa
COHb	Carboxihemoglobina
CPF	Córtex pré-frontal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ES	Estriado
Hb <sub>red</sub>	Hemoglobina reduzida
HC	Hipocampo
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPI	Imposto sobre produtos industrializados
ISO	International Organization for Standardization
LT	Locomoção total
LTP	Potencial de longa duração
nAChRs	Receptores nicotínicos da acetilcolina
NGF	Fator de crescimento neural
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBM	Proteína básica de mielina
PDGF $\alpha$ R	Receptor alfa do fator de crescimento derivados de plaquetas
PLP	Proteína proteolipídeo

RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
SNAREs	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) receptors</i>
SNC	Sistema nervoso central
TDAH	Transtorno de déficit de atenção com hiperatividade

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Desenvolvimento do SNC em humanos.....	23
<b>Figura 2:</b>	Desenvolvimento do SNC em roedores.....	24
<b>Figura 3:</b>	Mielinização do nervo óptico de ratos em diferentes idades.....	26
<b>Figura 4:</b>	Proteínas envolvidas na liberação dos neurotransmissores.....	29
<b>Figura 5:</b>	Câmara de exposição à fumaça do cigarro.....	42
<b>Figura 6:</b>	Labirinto aquático de Morris e pistas visuais.....	47
<b>Figura 7:</b>	Esquema do labirinto aquático de Morris.....	48
<b>Figura 8:</b>	Desenho experimental dos ensaios realizados.....	51
<b>Figura 9:</b>	Padronização de imunoblotting.....	57
<b>Figura 10:</b>	Peso de animais expostos à fumaça do cigarro.....	62
<b>Figura 11:</b>	Treino - memória de referência espacial.....	64
<b>Figura 12:</b>	Teste - memória de referência espacial.....	66
<b>Figura 13:</b>	Teste - memória operacional espacial.....	69
<b>Figura 14:</b>	Locomoção total em campo aberto.....	70
<b>Figura 15:</b>	Distância percorrida na zona central do campo aberto.....	71
<b>Figura 16:</b>	Número de entradas nos braços abertos em LCE.....	72
<b>Figura 17:</b>	Distância percorrida nos braços abertos em LCE.....	73
<b>Figura 18:</b>	Quantificação de BDNF.....	74
<b>Figura 19:</b>	Micrografias de imuno-histoquímica - sinapsina I em animais de 15 dias.....	76
<b>Figura 20:</b>	Quantificação de sinapsina I por imuno-histoquímica em animais de 15 dias.....	77

<b>Figura 21:</b> Quantificação de sinapsina I por immunoblotting em animais de 15 dias.....	78
<b>Figura 22:</b> Micrografias de imuno-histoquímica - sinaptofisina em animais de 15 dias.....	79
<b>Figura 23:</b> Quantificação de sinaptofisina por imuno-histoquímica em animais de 15 dias.....	80
<b>Figura 24:</b> Quantificação de sinaptofisina por immunoblotting em animais de 15 dias.....	81
<b>Figura 25:</b> Micrografias de imuno-histoquímica - sinapsina I em animais de 35 dias.....	82
<b>Figura 26:</b> Quantificação de sinapsina I por imuno-histoquímica em animais de 35 dias.....	83
<b>Figura 27:</b> Quantificação de sinapsina I por immunoblotting em animais de 35 dias.....	84
<b>Figura 28:</b> Micrografias de imuno-histoquímica - sinaptofisina em animais de 35 dias.....	85
<b>Figura 29:</b> Quantificação de sinaptofisina por imuno-histoquímica em animais de 35 dias.....	86
<b>Figura 30:</b> Quantificação de sinaptofisina por immunoblotting em animais de 35 dias.....	87
<b>Figura 31:</b> Micrografias de imuno-histoquímica - sinapsina I em animais de 65 dias.....	88
<b>Figura 32:</b> Quantificação de sinapsina I por imuno-histoquímica em animais de 65 dias.....	89

<b>Figura 33:</b> Quantificação de sinapsina I por immunoblotting em animais de 65 dias.....	90
<b>Figura 34:</b> Micrografias de imuno-histoquímica - sinaptofisina em animais de 65 dias.....	91
<b>Figura 35:</b> Quantificação de sinaptofisina por imuno-histoquímica em animais de 65 dias.....	92
<b>Figura 36:</b> Quantificação de sinaptofisina por immunoblotting em animais de 65 dias.....	93
<b>Figura 37:</b> Fibras mielinizadas e não mielinizadas do nervo óptico.....	95
<b>Figura 38:</b> Porcentagem de fibras mielinizadas.....	96
<b>Figura 39:</b> Micrografias ilustrando a área do nervo óptico.....	97
<b>Figura 40:</b> Área do nervo óptico.....	98
<b>Figura 41:</b> Quantificação de PBM por immunoblotting.....	100



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Desenvolvimento do SNC de camundongos e em humanos.....	31
<b>Tabela 2:</b>	Concentração de CO, COHb, nicotina e cotinina.....	61

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1. EXPOSIÇÃO AMBIENTAL À FUMAÇA DO CIGARRO .....	18
1.2. DESENVOLVIMENTO DO SNC .....	23
1.2.1. MIELINIZAÇÃO .....	25
1.2.2. SINAPTOGÊNESE .....	27
1.2.3. INFLUÊNCIA DA NICOTINA E DA FUMAÇA DO CIGARRO NO DESENVOLVIMENTO DO SNC .....	33
1.3. ANÁLISE COMPORTAMENTAL .....	35
2. OBJETIVOS .....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	41
3.1. PROTOCOLO DA EXPOSIÇÃO .....	41
3.2. MARCADORES BIOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO .....	43
3.2.1. DETERMINAÇÃO DA COHb .....	44
3.2.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NICOTINA E COTININA .....	45
3.3. ANÁLISE COMPORTAMENTAL .....	46
3.3.1. LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS .....	46
3.3.1.1. MEMÓRIA DE REFERÊNCIA ESPACIAL .....	48
3.3.1.2. MEMÓRIA OPERACIONAL ESPACIAL .....	49
3.3.2. CAMPO ABERTO .....	49
3.3.3. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO .....	50
3.3.4. QUANTIFICAÇÃO DO BDNF .....	51
3.3.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	53
3.3.6. IMMUNOBLOTTING .....	54

3.3.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	58
3.3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	59
4. RESULTADOS.....	61
4.1. MONITORIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO .....	61
4.1.1. PESO.....	61
4.2. ANÁLISE COMPORTAMENTAL E PROTEÍNAS SINÁPTICAS.....	63
4.2.1. LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS.....	63
4.2.1.1. MEMÓRIA DE REFERÊNCIA ESPACIAL.....	63
4.2.1.1.1. TREINO.....	63
4.2.1.1.2. TESTE.....	64
4.2.1.2. MEMÓRIA OPERACIONAL ESPACIAL.....	67
4.2.2. CAMPO ABERTO.....	69
4.2.3. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	71
4.2.4. BDNF.....	73
4.2.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA e IMMUNOBLOTTING.....	75
4.2.5.1. INFÂNCIA .....	75
4.2.5.2. ADOLESCÊNCIA.....	81
4.2.5.3. ADULTO.....	87
4.3. MIELINIZAÇÃO.....	94
4.3.1. FIBRAS MIELINIZADAS E ÁREA DO NERVO ÓPTICO.....	94
4.3.2. PROTEÍNA BÁSICA DE MIELINA.....	99
5. DISCUSSÃO .....	102
6. CONCLUSÕES.....	120
7. REFERÊNCIAS.....	122
ANEXOS .....	134

# INTRODUÇÃO

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. EXPOSIÇÃO AMBIENTAL À FUMAÇA DO CIGARRO**

A exposição de fumantes e não-fumantes à fumaça de produtos de tabaco é de grande importância para a saúde pública. No mundo, 12% de todas as mortes entre adultos com 30 anos ou mais foram atribuídas ao tabaco (OMS, 2012) e, aproximadamente 40% das crianças, 35% das mulheres e 33% dos homens são expostos ao fumo passivo (OBERG et al., 2011). No Brasil, estudos recentes demonstram que 46,7% dos universitários das 27 capitais já fizeram uso de produtos do tabaco pelo menos uma vez na vida e que 18,8% da população é exposta ao fumo passivo (ANDRADE; DUARTE; OLIVEIRA, 2010; INCA, 2010).

De acordo com a OMS, o tabagismo passivo é definido como a inalação da fumaça ambiental do tabaco e de seus derivados por indivíduos não-fumantes em ambientes fechados (INCA, 2008). A fumaça ambiental do tabaco contém centenas de substâncias químicas, tais como formaldeído, benzeno, arsênio, amônia, nitrosaminas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e é composta por uma mistura de fumaça central (10-20%) e de fumaça lateral (80-90%). A fumaça central é a tragada e expelida pelo fumante e a fumaça lateral é a produzida pela ponta acesa do cigarro (96% do tempo da queima do cigarro). É importante ressaltar que a fumaça lateral é mais tóxica e apresenta níveis mais elevados de nicotina, monóxido de carbono, amônia, aldeídos e substâncias cancerígenas (INCA, 2009; MELLO et al., 2005).

Entre os biomarcadores utilizados para identificar e medir o grau de exposição à fumaça ambiental do tabaco estão a nicotina (meia-vida de 2 h) e seu

metabólito, a cotinina (meia-vida de 40 h). Rosemberg (2004) destaca que após 4 horas de exposição ao tabaco ainda é possível encontrar nicotina no ar de ambientes fechados (ROSEMBERG, 2004). Precioso et al. (2007) realizaram um estudo para quantificar o nível de poluição do ar provocada pelo cigarro em locais de trabalho e de lazer em Portugal. Segundo os autores, a concentração de nicotina existente no ar de um ambiente fechado é uma medida objetiva do nível de fumaça ambiental do tabaco que seria inalado por uma pessoa no ambiente. Eles observaram a presença de nicotina em 85% dos locais avaliados. Os locais de trabalho da administração pública e de universidades apresentaram os valores mais baixos de nicotina, enquanto esta poluição mostrou-se elevada em alguns locais de trabalho em empresas, em restaurantes e particularmente em discotecas (PRECIOSO et al., 2007).

Matt et al. (2010) demonstraram que resíduos da fumaça do cigarro podem durar meses dentro de uma casa. Foram avaliados 100 lares de fumantes e 50 de não fumantes que planejavam se mudar. Os autores demonstraram que mesmo após a saída dos fumantes é possível encontrar resíduos oleosos da fumaça do cigarro mesmo com adequada limpeza. Neste estudo, foi possível observar que os níveis de nicotina no ar das casas, dois meses após os fumantes terem se mudado, ainda ficaram entre 35 e 98 vezes mais altos do que nas casas de não-fumantes. Em relação às superfícies dos móveis e paredes da casa notou-se que os níveis de nicotina foram de 30 a 150 vezes mais altos nas casas dos fumantes em comparação com as casas de não-fumantes. Além disso, os não-fumantes que se mudaram para casas de fumantes tinham níveis de nicotina nos dedos de 7 a 8 vezes maior do que aqueles que ficaram em casas de não-fumantes. O estudo

também mostrou presença de cotinina na urina de crianças 3 a 5 vezes maior do que em casas de não-fumantes (MATT et al., 2011).

A exposição involuntária à fumaça do tabaco pode acarretar desde reações alérgicas (rinite, tosse, conjuntivite, exacerbação de asma) em curto período, até infarto agudo do miocárdio, câncer de pulmão e doença pulmonar obstrutiva crônica (enfisema pulmonar e bronquite crônica) em adultos expostos por longo período (INCA, 2009). Alguns estudos comprovam que a longo prazo, o tabagismo passivo aumenta entre 20% a 30% o risco de um não fumante desenvolver câncer de pulmão, e entre 25% a 30% de sofrer infarto agudo do miocárdio (INCA, 2009).

Há algumas décadas surgiram estudos epidemiológicos avaliando os efeitos deletérios do fumo passivo em crianças. Geralmente, estes estudos têm como foco crianças menores de cinco anos, uma vez que nesta faixa etária não há exposição ocupacional e fumo ativo e o risco da exposição passiva pode ser avaliado durante o período do crescimento e desenvolvimento (CARVALHO; PEREIRA, 2002). Por viverem a maior parte do tempo em ambiente restrito e pela maior vulnerabilidade de suas vias aéreas, as crianças são mais susceptíveis aos efeitos do tabagismo passivo, apresentando elevada morbidade respiratória e mortalidade. Essas crianças apresentam mais tosse e infecções virais e são mais propensas a sofrer infecções do trato respiratório superior e inferior. Os mecanismos mais plausíveis são: edema da mucosa, diminuição do *clearance* mucociliar e prejuízo no desenvolvimento pulmonar (CARVALHO; PEREIRA, 2002).

Outra consequência importante da exposição de crianças ao fumo passivo é a síndrome de morte súbita infantil. Estudo da OMS com 700 milhões de crianças no mundo demonstrou um risco aumentado em cinco vezes para esta síndrome em filhos de mães fumantes (INCA, 2009; MITCHELL; MILERAD, 1999).

No Brasil, pesquisadores do Instituto Nacional de Câncer (INCA) e do Instituto de Estudos de Saúde Coletiva da Universidade Federal do Rio de Janeiro constataram que pelo menos 2.655 não-fumantes morrem a cada ano no Brasil por doenças atribuíveis ao tabagismo passivo (INCA, 2008). Neste estudo, que estimou o número e a proporção de óbitos, foram consideradas apenas as três principais doenças relacionadas ao tabagismo passivo: câncer de pulmão, doenças isquêmicas do coração (como infarto) e acidentes vasculares cerebrais (AVC). Foi observado que a cada 1.000 mortes por doenças cérebro-vasculares, 29 são atribuíveis à exposição passiva à fumaça do cigarro. A proporção é de 25 para 1.000 no caso de doenças isquêmicas e de sete para 1.000 mortes por câncer de pulmão. Os óbitos de mulheres são de 1,3 a 3 vezes mais elevados que os de homens. Das 2.655 mortes, 1.601 foram de mulheres, ou seja, 60,3%.

Para diminuir os danos causados pelo fumo passivo são necessárias políticas públicas de controle. No Brasil, o controle do tabaco começou na década de 80, mais precisamente em 1986, com a restrição do fumo em repartições públicas. Uma das medidas mais eficazes foi a proibição da publicidade do tabaco (exceto nos pontos de venda) no ano 2000. Dois anos mais tarde, passou a ser obrigatória a publicação de imagens de advertência nos maços e em 2005, o país ratificou sua adesão à Convenção-Quadro de Controle do Tabaco, proposta pela OMS (INCA, 2009).

Entre as diretrizes recomendadas pela OMS para que os países diminuam o consumo de tabaco está o aumento do preço dos maços de cigarros, por meio da elevação de impostos e a proibição do uso do tabaco em locais públicos (OMS, 2008). Em maio de 2009 o governo brasileiro aumentou o Imposto sobre Produtos Industrializados (IPI) e a Contribuição para o Financiamento de Seguridade Social



(PIS/Cofins) sobre o produto, o que elevou o preço ao consumidor em até 25%. Vale destacar que o preço do maço de cigarros no Brasil é um dos mais baratos do mundo. Ainda segundo a OMS, o aumento de 10% no preço do cigarro diminuiu em 4 a 8% o consumo do produto (GOV SP, 2009; OMS, 2008). Além disso, a partir de 2009 alguns estados como São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro proibiram o uso do tabaco em ambientes públicos fechados.

De acordo com estudo realizado por Pinto (2007) o tabaco causa um prejuízo anual de, pelo menos, R\$ 338,6 milhões ao Sistema Único de Saúde, sendo que 33,85% desse valor é gasto no tratamento de diversos tipos de cânceres. Vale ressaltar que esse valor é subestimado já que contabiliza apenas o que foi gasto com procedimento de quimioterapia e internações relacionadas a 32 doenças, como câncer (oral, faringe, traqueia, brônquios, pulmão, entre outros), doenças cardio e cerebrovasculares e doenças relacionadas ao aparelho respiratório. Pinto (2007) selecionou as doenças a partir do *Cancer Prevention Study II (CPS-II)*, um estudo prospectivo realizado pela *American Cancer Society* que estabelece a associação entre o tabagismo e diversas enfermidades (PINTO, 2007).

Embora a prevalência do tabagismo esteja reduzindo no país, seus efeitos sobre a morbidade e mortalidade ainda serão observados nas próximas décadas, o que exigirá a continuidade da aplicação de recursos no tratamento das doenças relacionadas ao tabaco e no fortalecimento das ações de controle ao tabagismo (OMS, 2012; PINTO, 2007).

## 1.2. DESENVOLVIMENTO DO SNC

O desenvolvimento é um processo que se inicia na concepção e se estende ao longo da vida. Durante esse período há alterações fisiológicas e comportamentais induzidas por influências genéticas e ambientais. Em relação ao desenvolvimento do SNC, alguns processos são finalizados intra-útero enquanto outros continuam durante anos após o nascimento, como pode ser observado na Figura 1.

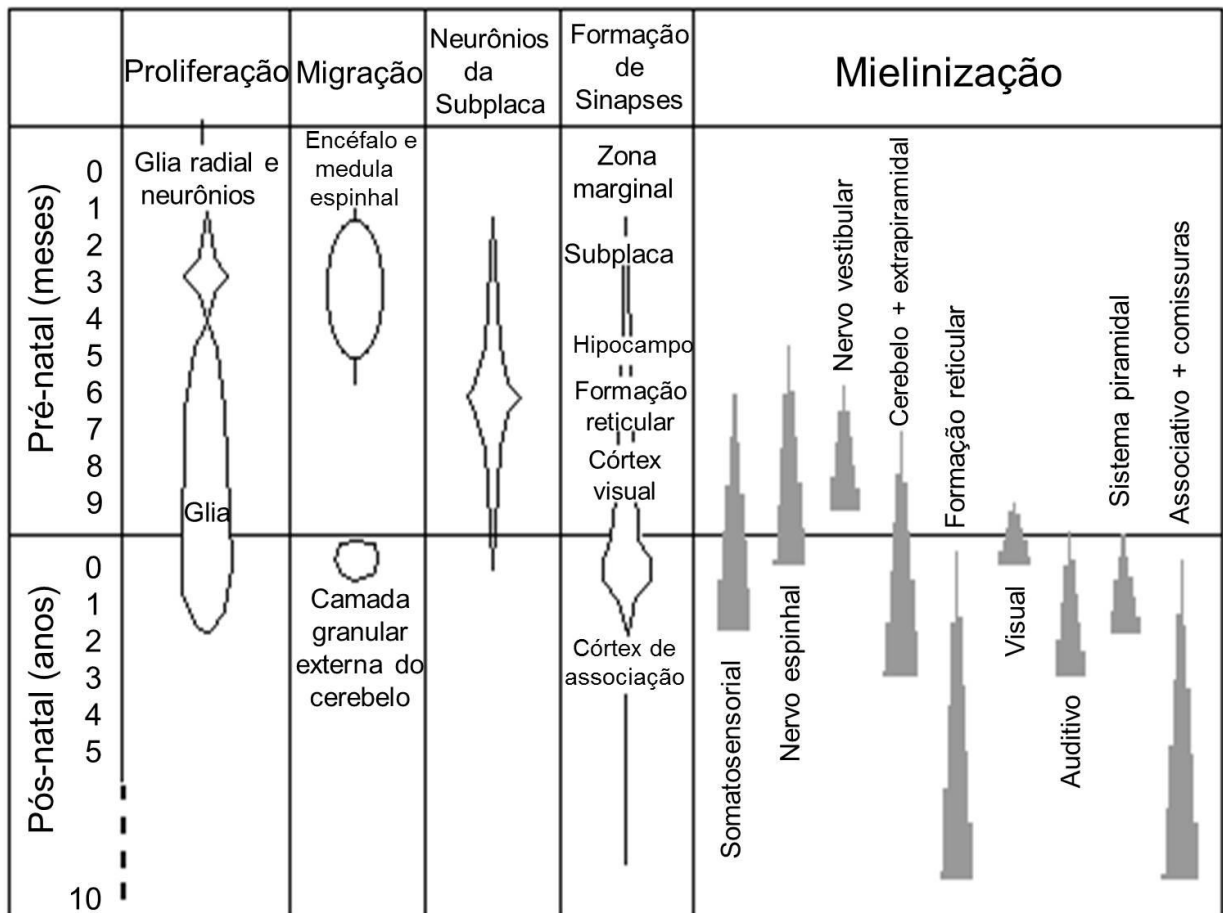


Figura 1: Decurso temporal de alguns processos característicos do desenvolvimento do SNC em humanos. Adaptado de (RICE; BARONE, 2000).

O processo normal de desenvolvimento neural de roedores é diferente do humano. Os roedores apresentam considerável desenvolvimento pós-natal (Figura 2), sendo que em humanos, grande parte do desenvolvimento ocorre no período pré-natal. As duas primeiras semanas do período pós-natal de roedores equivalem ao terceiro trimestre de gestação em humanos. Esse período caracteriza-se por um rápido crescimento encefálico incluindo arborização dendrítica, crescimento axonal, mielinização e pico dos processos de sinaptogênese, gliogênese e maturação da neurotransmissão (BAYER et al., 1993; DWYER; BROIDE; LESLIE, 2008; DWYER; MCQUOWN; LESLIE, 2009; QUINN, 2005).

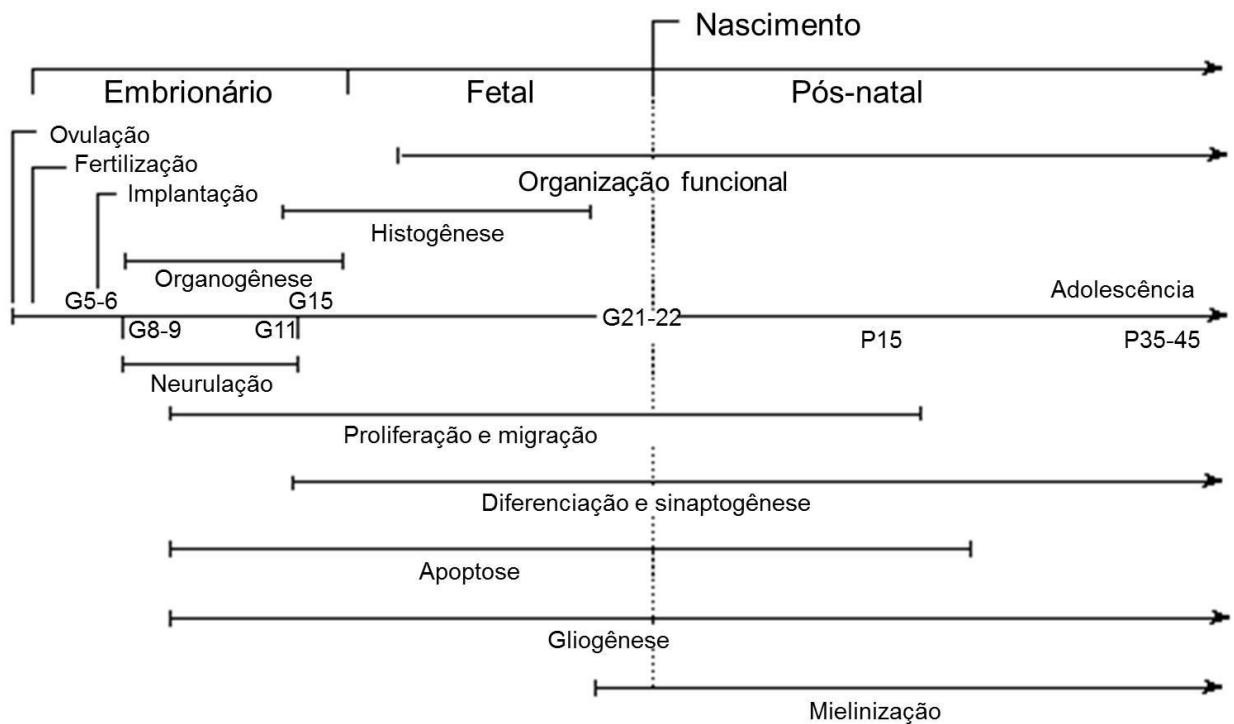


Figura 2: Decurso temporal de alguns processos característicos do desenvolvimento do SNC em roedores. Tempo expresso em dias gestacionais (G) e dias pós-natal (P). Adaptado de (RICE; BARONE, 2000).

### 1.2.1. MIELINIZAÇÃO

Entre as espécies a bainha de mielina é considerada a mais recente evolução do sistema nervoso e está envolvida com a maturação estrutural do tecido e com o desenvolvimento motor, sensorial e cognitivo. Em humanos, a mielinização ocorre principalmente entre o 2º semestre de vida pré-natal e o 2º ano de vida pós-natal. A mielina é produzida durante toda a vida, contudo, na fase adulta este processo ocorre em menor proporção (VALENTE, 2006). Em roedores, o processo de mielinização do SNC se inicia no final da gestação, mas é predominante nas três primeiras semanas após o nascimento (DORETTO et al., 2011). Uma vez formada, a bainha de mielina é bastante estável e resistente aos fatores externos, mas durante o período de síntese e deposição, é uma estrutura vulnerável (VALENTE, 2006).

O processo de mielinização segue a sequência de desenvolvimento onto e filogenético e, portanto, segue ao longo de um eixo caudal-rostral. As primeiras células precursoras de oligodendrócitos, responsáveis pela produção da mielina no SNC, aparecem por volta da nona semana em humanos e são caracterizadas pela expressão de Olig 1, receptor alfa do fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF $\alpha$ R) e de NG2. A maturação dos oligodendrócitos é marcada pela expressão da proteína básica de mielina (PBM) e da proteína proteolípídeo (PLP) (FERNÁNDEZ et al., 2010). Em roedores, no primeiro dia de vida pós-natal os oligodendrócitos maduros já expressam marcadores como a PBM na medula espinhal (DORETTO et al., 2011).

Durante o desenvolvimento, o diâmetro axonal e a camada de mielina sofrem mudanças significativas tanto em humanos quanto em roedores (DANGATA; FINDLATER; KAUFMAN, 1996; TENNEKOON et al., 1977). A Figura 3 apresenta o

processo de mielinização no nervo óptico de ratos durante as primeiras semanas de vida pós-natal.

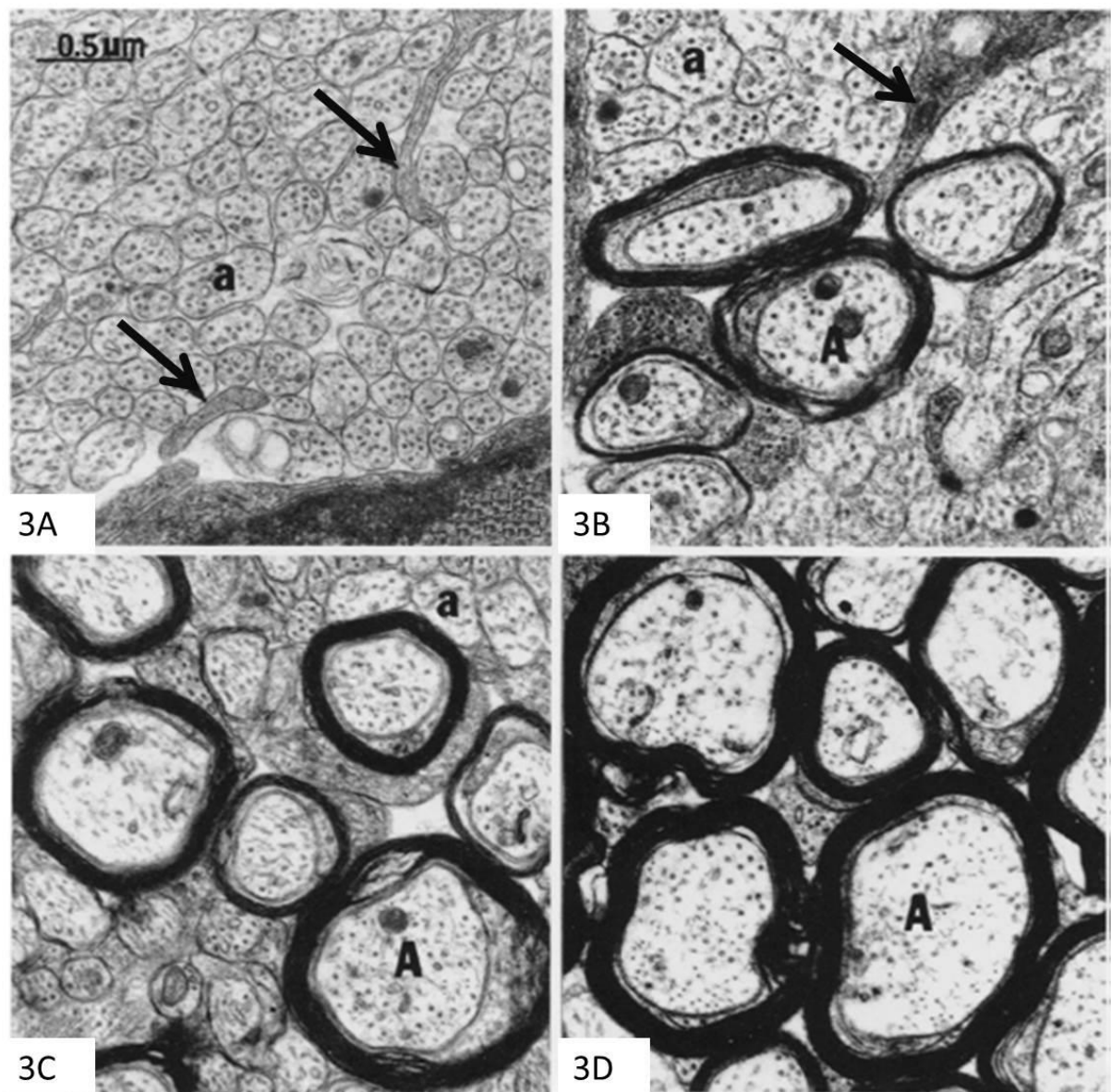


Figura 3: Mielinização do nervo óptico de ratos em diferentes idades. 3A: 2 dias de vida pós-natal; 3B: 10 dias de vida pós-natal; 3C: 14 dias de vida pós-natal; 3D: 28 dias de vida pós-natal. Setas: Processos dos oligodendrócitos; A: fibras mielínicas; a: fibras amielínicas. 25.000x. (Adaptado de TENNEKOON et al., 1977).

No segundo dia de vida pós-natal há apenas pequenas fibras amielínicas. Com 10 dias de vida pós-natal já é possível observar axônios em diversos níveis de mielinização. Aos 14 dias de vida, a maioria das fibras nervosas ainda são amielínicas, contudo, há axônios de maior diâmetro mielinizados. Com 28 dias de vida pós-natal, os roedores apresentam 85% dos axônios mielinizados. Nesta fase é possível notar axônios de maior diâmetro e bainha de mielina compacta (TENNEKOON et al., 1977).

### **1.2.2. SINAPTOGÊNESE**

Durante a vida adulta há contínua recapitulação da sinaptogênese devido à plasticidade sináptica. Esta plasticidade se deve às experiências e aos estímulos ambientais que promovem contínuo remodelamento sináptico tanto no período de desenvolvimento quanto no sistema nervoso adulto. Portanto, a sinaptogênese e a plasticidade sináptica são processos dependentes que ocorrem simultaneamente (MOURA-RIBEIRO; GONÇALVES, 2006; RICE; BARONE, 2000).

De maneira didática, é possível dividir a sinaptogênese em três fases: 1- formação das sinapses, que depende de informações genéticas nas primeiras etapas do desenvolvimento e são representadas pelas interações célula-célula; 2- afinação das sinapses recém-desenvolvidas, que exige um padrão apropriado de atividade neuronal e é influenciada por estímulos ambientais e 3- regulação da eficácia sináptica, que ocorre diariamente durante o curso da vida e é determinada pela experiência (PIOVESANA; GONÇALVES, 2006).

O processo de sinaptogênese caracteriza-se por mudanças bioquímicas e morfológicas em elementos pré e/ou pós-sinápticos. Como exemplo desses elementos pode-se citar as proteínas de vesículas pré-sinápticas, como a sinaptofisina e a sinapsina, que estão envolvidas na formação e na plasticidade das sinapses (KIM et al., 2003; MULLANY; LYNCH, 1998; STEINER et al., 2008; ZHAO et al., 2000).

A sinaptofisina, primeira proteína integral de membrana de vesícula a ser isolada e clonada (VALTORTA et al., 2004), desempenha importante função tanto na biogênese quanto na exo-endocitose das vesículas sinápticas. Já as sinapsinas têm papel crítico nas sinapses por regular a liberação das vesículas sinápticas e consequentemente, dos neurotransmissores (FERREIRA, 2006; PENNUTO et al., 2003). As sinapsinas se ligam a vários elementos do citoesqueleto, especialmente actina e, assim, ancoram as vesículas sinápticas. Sua fosforilação libera as vesículas sinápticas do citoesqueleto, permitindo a migração para a fusão com a membrana plasmática (BENFENATI et al., 1989; FERREIRA, 2006; HOSAKA; HAMMER; SÜDHOF, 1999; PIERIBONE et al., 1995). A Figura 4 mostra um diagrama das proteínas da vesícula sináptica.

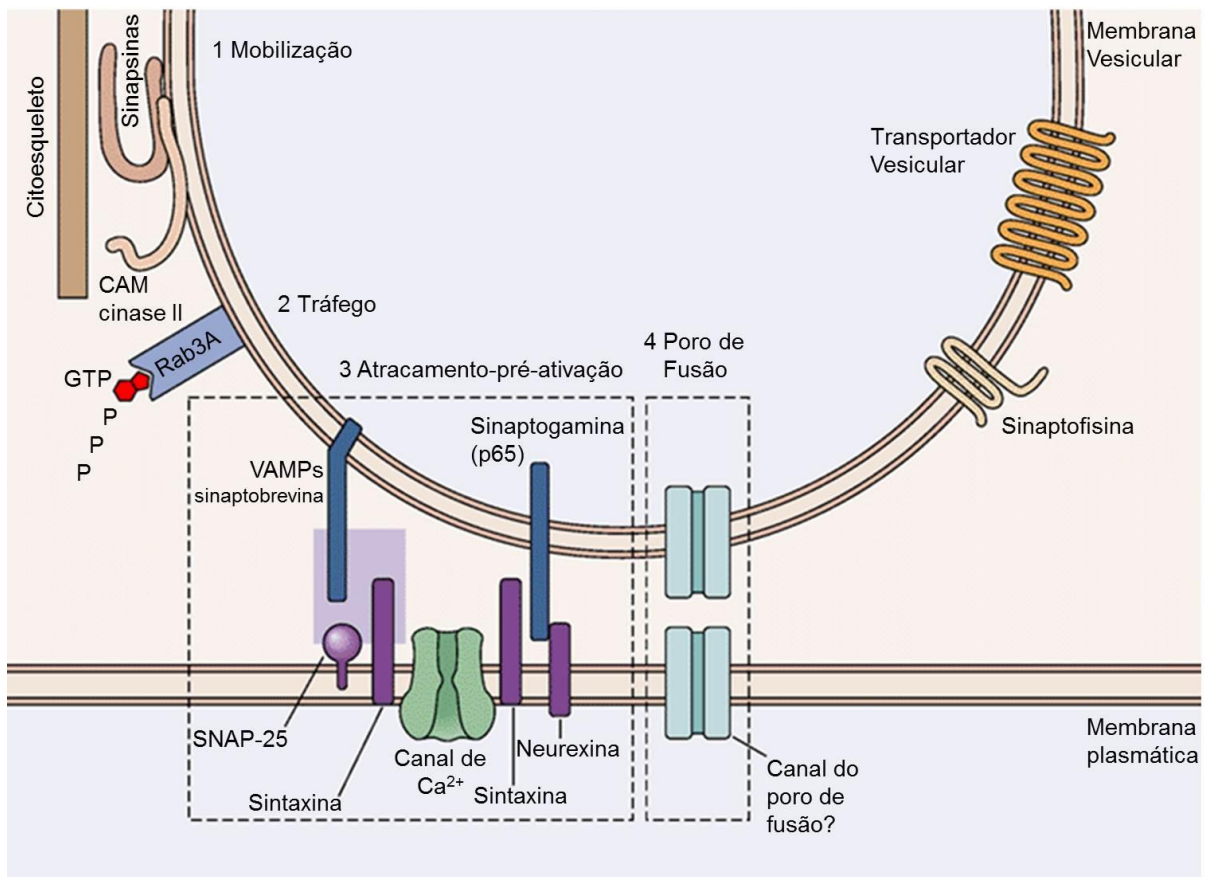


Figura 4: Proteínas da vesícula sináptica envolvidas no (1) armazenamento, (2) no tráfego e direcionamento de vesículas para as zonas ativas, (3) no atracamento das vesículas ativas e sua pré-ativação para liberação e (4) na liberação dos neurotransmissores (Adaptado de KANDEL; SIEGELBAUM, 2003).

Durante o desenvolvimento, as conexões sinápticas são remodeladas e refinadas principalmente por meio da redução de células (apoptose) e sinapses. O processo de viabilidade celular é competitivo e depende tanto da atividade neural e da transmissão sináptica quanto de fatores neurotróficos, como o fator de crescimento neural (NGF), o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e as neurotrofinas NT-3, NT-4/5, NT-6. O BDNF tem papel significativo na promoção do desenvolvimento normal do sistema nervoso e na regulação da sobrevivência celular (TANG; MACHAALANI; WATERS, 2008), além de estar envolvido na plasticidade sináptica e em mecanismos de aprendizagem, como potencial de longa duração



(LTP) e consolidação da memória (LANG et al., 2007; THOENEN, 1995). Aguado et al. (2003) realizaram um estudo com embriões (18 dias) de camundongos transgênicos que possuíam uma superexpressão de BDNF e demonstraram que esse fator neurotrófico promove aumento do número de sinapses ainda no início do processo de desenvolvimento do sistema nervoso (AGUADO et al., 2003).

No presente trabalho a sinaptogênese foi avaliada por meio das proteínas pré-sinápticas sinaptofisina e sinapsina e do BDNF no hipocampo, cerebelo, córtex pré-frontal e estriado, que são estruturas encefálicas com considerável desenvolvimento pós-natal em roedores. Como mencionado anteriormente, o desenvolvimento do SNC não é um processo uniforme, já que há crescimento e maturação diferencial entre as estruturas encefálicas. Ainda, é importante salientar que embora o decurso temporal de desenvolvimento do SNC seja diferente entre humanos e roedores é possível correlacionar os estudos experimentais entre as duas espécies (WORKMAN et al., 2013). A Tabela 1 apresenta uma comparação entre o decurso temporal do desenvolvimento de estruturas encefálicas de camundongos e de humanos.

Tabela 1: Comparação entre o decurso temporal do desenvolvimento de estruturas encefálicas em camundongos e em humanos (WORKMAN et al., 2013).

	Desenvolvimento encefálico		Neurogênese	
	Camundongos	Humanos	Camundongos	Humanos
Hipocampo	P15	3 meses	P15	3 meses
	P35	1 ano e 8 meses	P35	1 ano e 8 meses
Cerebelo	P15	3 meses	P15	3 meses
	P35	1 ano e 8 meses	P35	1 ano e 8 meses
Córtex	P15	3 meses	P15	6 meses
	P35	1 ano e 8 meses	P35	2 anos e 5 meses
Estriado	P15	3 meses e	P15	3 meses
	P35	1 ano 8 meses	P35	1 ano e 8 meses

O hipocampo, localizado no telencéfalo, é uma das estruturas do sistema límbico e está envolvido em funções importantes, como aprendizagem e memória. O desenvolvimento do hipocampo se estende durante a vida pós-natal por meio de neurogênese e maturação das sinapses. Em roedores, a proliferação de células piramidais nas regiões CA1 e CA3 ocorre principalmente durante o período embrionário E14-19, contudo, sua maturação se estende no período pós-natal, em especial nas quatro primeiras semanas após o nascimento (BAYER, 1980; PICÓN, 2008).

O cerebelo desempenha um papel importante no controle motor, além de estar envolvido em algumas funções cognitivas, tais como atenção e linguagem. O desenvolvimento do córtex cerebelar humano se estende até o primeiro ano de vida, enquanto em ratos esse período ocorre no início da vida pós-natal, entre os dias P8 e P24 (DOBBING, 1982; FULLER et al., 2012).

O estriado, formado pelo núcleo caudado e pelo putâmen, tem um papel importante em atividades motoras, cognitivas e funções límbicas. A neurogênese no estriado de roedores ocorre entre o 12º dia de gestação e os primeiros dias do período pós-natal, com pico no 14º e 15º dia gestacional. Contudo, processos como sinaptogênese e mielinização ocorrem no início do período pós-natal, sendo a sinaptogênese entre o P3 e P24 e o início da mielinização em P14 (CLANCY et al., 2013; EVANS et al., 2012; FENTRESS et al., 1981).

Já no córtex pré-frontal o pico de densidade sináptica ocorre em P27 em camundongos, enquanto em humanos, no primeiro ano de vida. O córtex pré-frontal é responsável pela análise cognitiva e pelo pensamento abstrato, além da moderação do comportamento social e moral (CLANCY et al., 2013).

O desenvolvimento é considerado um período crítico até as primeiras semanas de vida pós-natal em roedores e os primeiros anos de vida em humanos. Durante esse período vulnerável, quaisquer perturbações na sequência de eventos normais causam efeitos irreversíveis na estrutura e na função do tecido (MOURA-RIBEIRO; GONÇALVES, 2006; RICE; BARONE, 2000).

Diversos agentes ambientais, como o etanol e o chumbo, podem causar neurotoxicidade durante as primeiras fases do desenvolvimento (JACOBSON, 1991; MOURA-RIBEIRO; GONÇALVES, 2006; RICE; BARONE, 2000). Em geral, estudos em roedores indicam que os efeitos desses agentes são mais evidentes quando a exposição ocorre durante a primeira e a segunda semana pós-natal, período em que esse processo tem maior atividade (RICE; BARONE, 2000).

### **1.2.3. INFLUÊNCIA DA NICOTINA E DA FUMAÇA DO CIGARRO NO DESENVOLVIMENTO DO SNC**

O hábito de fumar durante a gravidez está relacionado à maior incidência de aborto espontâneo, mortalidade fetal e síndrome da morte súbita infantil. Crianças que são expostas à fumaça do cigarro durante a gestação apresentam déficits nas habilidades motoras finas, atenção, processo auditivo e distúrbios comportamentais como hiperatividade, impulsividade, agressividade e distúrbios de conduta, além de maior susceptibilidade ao abuso de drogas na adolescência (CUTLER et al., 1996; EPPOLITO; SMITH, 2006; ERNST; MOOLCHAN; ROBINSON, 2001; GOOD et al., 2006).

Bandiera et al. (2011) observaram que em crianças e adolescentes (8-15 anos) expostos ao fumo passivo, o nível sérico de cotinina se correlacionou com os sintomas do transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (TDAH), depressão, ansiedade e comportamento antissocial. Os autores ainda notaram que tal associação foi mais evidente nos meninos. Foram avaliadas 201 crianças, das quais 7% apresentam TDAH (na população em geral, esse índice é de 5%), 7,5% depressão e 4,4%, ansiedade (BANDIERA; RICHARDSON; LEE, 2011).

Apesar da fumaça do cigarro ser composta por mais de 4700 substâncias, a maioria dos estudos experimentais em animais tem como foco os efeitos da nicotina. Como exemplo, pode-se citar ratos que receberam nicotina no final da gestação e no início do período pós-natal e exibiram menor quantidade de DNA total no encéfalo quando comparados aos controles. Esta diminuição reflete uma redução no número total de células, e sugere que a nicotina inibe ou reduz o aumento do número de células que caracteriza a maturação encefálica (DWYER; BROIDE; LESLIE, 2008;

SLOTKIN et al., 1987). Durante o início do período pós-natal, a nicotina também induz a superexpressão da atividade da ornitina descarboxilase que tem importante função no desenvolvimento celular do SNC. Como o aumento da sua atividade indica maturação celular anormal, a nicotina pode desencadear alterações na proliferação e na diferenciação neuronal (DWYER; BROIDE; LESLIE, 2008; NAVARRO et al., 1989; SLOTKIN et al., 1987).

Mudanças neuroquímicas, como danos na migração, proliferação e diferenciação celular, além de alterações funcionais nos sistemas colinérgicos e catecolaminérgicos são observadas em ratos expostos à nicotina no período pré-natal (EPPOLITO; SMITH, 2006; ERNST; MOOLCHAN; ROBINSON, 2001). A exposição crônica à nicotina neste período resulta na superexpressão de receptores para dopamina e noradrenalina, sugerindo que a nicotina prejudica a atividade sináptica (EPPOLITO; SMITH, 2006; LEVIN et al., 1993).

Estudos realizados em roedores mostram que a acetilcolina tem papel crítico na maturação encefálica pela ativação de nAChRs, que são amplamente expressos no SNC fetal, com superexpressões transitórias em diversas regiões encefálicas, como hipocampo e medula espinhal, durante períodos críticos de desenvolvimento. A ativação desses receptores pode influenciar no desenvolvimento do SNC, como por exemplo, na regulação da liberação de neurotransmissores, expressão gênica, sobrevivência celular, formação de sinapses e maturação do SNC (DWYER; BROIDE; LESLIE, 2008; SLOTKIN, 2004).

A exposição pré-natal à nicotina causa déficits na atenção e memória espacial de roedores, observados em labirinto aquático de Morris e labirinto radial (CUTLER et al., 1996; EPPOLITO; SMITH, 2006; LEVIN et al., 1993; SORENSON; RASKIN; SUH, 1991). Vaglenova et al. (2004) sugerem que a exposição pré-natal à nicotina

causa danos ao crescimento pré e pós-natal, além de déficits comportamentais durante a infância e a adolescência de ratos Sprague-Dawley. Portanto, causa prejuízos não só no início do desenvolvimento, mas também a longo prazo. Os autores avaliaram os efeitos da exposição pré-natal à nicotina e observaram que os animais mostraram retardo no crescimento, hiperatividade, dificuldade de adaptação a um novo ambiente, aumento da ansiedade durante o início da adolescência e deficiência cognitiva quando adultos (VAGLENOVA et al., 2004).

### **1.3. ANÁLISE COMPORTAMENTAL**

O comportamento representa uma relação entre a fisiologia e o ambiente externo e, portanto, variações fisiológicas podem induzir comportamentos específicos e previsíveis (WEBER, 1997). Estudos neurocomportamentais podem ser úteis na avaliação dos efeitos da exposição prolongada às substâncias químicas e entre os modelos comportamentais mais utilizados estão o campo aberto e o labirinto em cruz elevado (MARTINS, 2009).

O campo aberto é um instrumento destinado à avaliação da atividade exploratória de roedores e permite a avaliação do medo. Por ser uma arena circular vazia, é um ambiente aversivo aos animais, que tendem a permanecer mais tempo na periferia do que no centro da arena, comportamento denominado tigmotaxia. Roedores com medo apresentam comportamento tigmotático, já que não exploram a área central da arena (CRUZ et al., 1997). Além disso, o campo aberto pode ser utilizado para inferir ansiedade, uma vez que substâncias ansiolíticas revertem o comportamento tigmotático (MARTINS, 2009).

O labirinto em cruz elevado é um modelo utilizado para avaliar ansiedade. Neste caso, os animais tendem a permanecer mais tempo nos braços fechados, já que ambientes abertos são naturalmente aversivos. O número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos são usados como indicadores de ansiedade. Fármacos ansiolíticos elevam o tempo de permanência nos braços abertos (PELLOW et al., 1985).

Para avaliar o processo de aprendizagem e memória espacial em roedores uma das principais ferramentas é o labirinto aquático de Morris (GIMENES, 2008; SANTOS, 1999). Este labirinto consiste em uma piscina circular preenchida com água, contendo uma plataforma de acrílico submersa 1 cm abaixo do nível da água em local pré-determinado. O animal deve encontrar a plataforma, onde pode escapar da água. Contudo, deve fazer isso apenas com o auxílio de pistas distais distribuídas na sala de experimentação. A água deve se tornar opaca pela adição de leite, para que o animal não veja a plataforma e ela se torne uma pista proximal (SANTOS, 1999; VALADARES, 2006). Segundo O'Keefe e Nadel (1978) animais possuem a capacidade de aprender relações espaciais entre objetos e de utilizar essas relações para se localizarem em determinado ambiente, independente de sua própria localização (O'KEEFE; NADEL, 1978). Ao utilizar apenas pistas distais o animal é obrigado a realizar a construção de um mapa aloentrico do ambiente, já que é necessário que ele conheça a relação angular entre as diferentes pistas (XAVIER; OLIVEIRA-FILHO; SANTOS, 1999).

O fumo passivo é um problema de saúde pública e diversos trabalhos comprovam seus efeitos deletérios, principalmente no sistema respiratório (FELESZKO et al., 2006; JINDAL; GUPTA, 2004; SKORGE et al., 2005). Sabe-se que 40% das crianças no mundo são expostas ao fumo passivo (OBERG et al., 2011), que é responsável por elevada morbidade respiratória e mortalidade em crianças de baixa idade (CARVALHO; PEREIRA, 2002). Apesar desses dados, poucos trabalhos têm como foco os efeitos do fumo passivo no SNC. Até o momento, este é o único estudo experimental em roedores que associa dados bioquímicos e comportamentais ao avaliar os efeitos do fumo passivo no início do desenvolvimento e as possíveis consequências na adolescência e na fase adulta.



## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal no desenvolvimento do SNC na infância e as possíveis consequências na adolescência e na fase adulta.

### ***Estratégias Experimentais***

- ✓ Realizar exposições à fumaça do cigarro no início do período pós-natal para as seguintes análises bioquímicas e comportamentais na infância, adolescência e fase adulta.
  - Avaliação a transmissão sináptica por meio da quantificação das proteínas sinápticas sinapsina I e sinaptofisina no hipocampo, cerebelo, córtex pré-frontal e estriado.
  - Avaliação dos efeitos da fumaça do cigarro nos níveis proteicos do BDNF no hipocampo, cerebelo, córtex pré-frontal e estriado.
  - Estudo dos efeitos da fumaça do cigarro na aprendizagem e memória, na atividade locomotora e ansiedade.
  - Avaliação dos efeitos da fumaça do cigarro no processo de mielinização por meio de microscopia eletrônica de transmissão do nervo óptico e da quantificação da PBM no telencéfalo, diencéfalo, cerebelo e tronco encefálico.

# MATERIAIS E MÉTODOS

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. PROTOCOLO DA EXPOSIÇÃO

Foram utilizados camundongos BALB/c fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O projeto foi aprovado pelas Comissões de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq – Protocolo n° 1038/09) e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEEA - Protocolo n° 260). Os certificados de aprovação estão no anexo 1. Os animais foram mantidos em ciclo de 12 horas claro/escuro (7:00 e 19:00h), com água e comida à vontade.

No primeiro dia de vida os animais foram manipulados para que cada mãe ficasse com sete filhotes para não haver diferença entre as ninhadas. Eles foram expostos à fumaça do cigarro, acompanhados pelas mães, a partir do 3° dia de vida (P3) até o 14° dia (P14) duas vezes ao dia em dois horários, 8:00 e 16:00h, com duração de uma hora. Os animais do grupo controle foram colocados em uma câmara semelhante e inalaram apenas ar comprimido.

Os animais foram expostos a uma mistura de fumaça central e fumaça lateral numa câmara de polipropileno (564x385x371mm) dentro de uma capela. Na câmara havia quatro aberturas para entrada de um fluxo de ar comprimido, da fumaça lateral, da fumaça central e para troca com o ambiente. Foram utilizados cigarros 3R4F (nicotina: 0,726 mg/cigarro; alcatrão: 9,4 mg/cigarro; monóxido de carbono: 11,9 mg/cigarro) desenvolvidos pela Universidade de Kentucky (EUA).

Enquanto a fumaça lateral foi produzida pela ponta de um cigarro aceso colocado em uma das aberturas da câmara, a fumaça central foi produzida pelo

sistema Venturi. Nesse sistema, constituído por uma tubulação suavemente cônica, o fluxo laminar de ar comprimido passa de uma região de maior para uma de menor diâmetro. Com isso, há aceleração do fluxo de ar e conseqüente redução da pressão nesse ponto (efeito Venturi), o que permite que a fumaça do cigarro seja aspirada. Assim, a entrada para fumaça central recebia uma mistura de ar comprimido e fumaça do cigarro (Figura 5).

Em cada hora de exposição eram utilizados entre 4 e 6 cigarros para fumaça central e 6 cigarros para fumaça lateral. Vale destacar que o cigarro utilizado no sistema Venturi também produzia fumaça lateral, mas esta era eliminada pelo sistema de exaustão da capela.

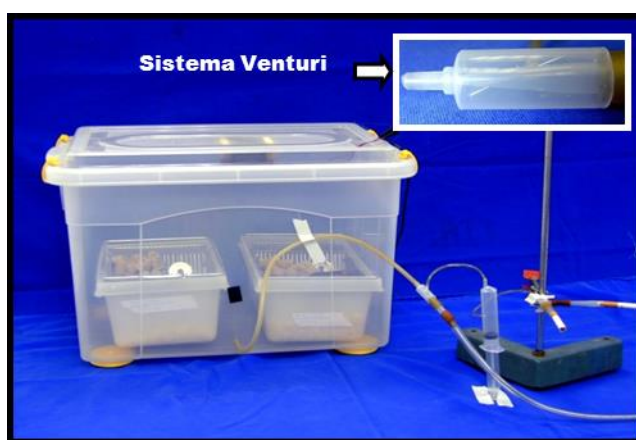


Figura 5: Câmara de exposição à fumaça do cigarro.

A quantidade de partículas de monóxido de carbono (CO) presente na fumaça inalada pelos animais foi monitorada a cada 10 minutos por meio de um detector de gases específico da marca Biosystems (ToxiPro, Biosystems, EUA).

Para avaliar os efeitos da exposição à fumaça do cigarro nas primeiras semanas de vida pós-natal, os animais foram submetidos a estudos

comportamentais e eutanasiados para realização de estudos bioquímicos na infância (P15), adolescência (P35) e idade adulta (P65). Para cada grupo foram utilizados animais machos e fêmeas, selecionados aleatoriamente, de diversas ninhadas. As análises foram realizadas em seis grupos experimentais, como descrito a seguir:

- ✓ Grupo Tratado I – (P15T) – animais expostos à fumaça do cigarro por 12 dias e eutanasiados 24 horas após a última exposição.
- ✓ Grupo Controle I – (P15C) – animais expostos ao ar comprimido por 12 dias e eutanasiados 24 horas após a última exposição.
- ✓ Grupo Tratado II – (P35T) – animais expostos à fumaça do cigarro por 12 dias e eutanasiados no 35º dia de vida.
- ✓ Grupo Controle II – (P35C) – animais expostos ao ar comprimido por 12 dias e eutanasiados no 35º dia de vida.
- ✓ Grupo Tratado III – (P65T) – animais expostos à fumaça do cigarro por 12 dias e eutanasiados no 65º dia de vida.
- ✓ Grupo Controle III – (P65C) – animais expostos ao ar comprimido por 12 dias e eutanasiados no 65º dia de vida.

### **3.2. MARCADORES BIOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO**

A carboxihemoglobina (COHb), a nicotina e a cotinina foram utilizadas como marcadores biológicos para a exposição à fumaça do cigarro.

### 3.2.1. DETERMINAÇÃO DA COHb

Para a dosagem de COHb utilizou-se o método de Beutler e West (1984) modificado por Malheiro (1991). A modificação introduzida foi realizada na etapa de determinação dos fatores de calibração durante a padronização do método, quando foi realizado borbulhamento com N<sub>2</sub> para evitar que o CO dissolvido na amostra interferisse nos resultados. O princípio do método consiste na redução da hemoglobina com ditionito de sódio formando hemoglobina reduzida (Hb<sub>red</sub>), a desoxihemoglobina. Este agente reduz todas as formas de hemoglobina (metemoglobina e a oxihemoglobina), exceto a COHb. Os fatores de calibração devem ser calculados para cada espectrofotômetro e, no caso, os fatores obtidos foram: F1: 1,2814; F2: 0,7672 e F3: 1,9170 (BEUTLER; WEST, 1984; MALHEIRO, 1991). A técnica utilizada no estudo está descrita a seguir.

#### a) Determinação dos fatores de calibração:

Em dois tubos de ensaio (A e B), adicionou-se 3,0 mL do hemolisado, preparado pela diluição de 100 µL de sangue total de não-fumante em 12 mL de solução hemolisante (tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M pH=6,85/água 1:10). No balão A, borbulhou-se CO por 3 minutos enquanto no balão B borbulhou-se O<sub>2</sub> por 15 minutos. Ambos os tubos foram fechados imediatamente. As soluções com 100% de COHb e 100% de O<sub>2</sub>Hb foram submetidas à corrente de N<sub>2</sub> por 2,5 minutos. Os tubos foram imediatamente fechados após o borbulhamento e 2,0 mL de cada solução foram diluídos com solução redutora (25mg de ditionito de sódio em 20 mL de tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M pH=6,85) em balões volumétricos de 25 mL. A

leitura das absorbâncias das soluções A e B foram realizadas em 420 e 432 nm. Segue o cálculo dos fatores F1, F2 e F3.

$$F1 = \frac{\text{Abs Hb}_{\text{red}} 432}{\text{Abs Hb}_{\text{red}} 420} \quad F2 = \frac{\text{Abs COHb } 432}{\text{Abs Hb}_{\text{red}} 420} \quad F3 = \frac{\text{Abs COHb } 420}{\text{Abs Hb}_{\text{red}} 420}$$

b) Determinação da porcentagem de COHb:

Em um tubo de ensaio com tampa adicionou-se 0,1 mL de sangue total e 12 mL de solução hemolisante. Após homogeneização por inversão, a solução foi deixada em repouso por 10 minutos. Então, 0,2 mL do hemolisado foram diluídos com 2,3 mL de solução redutora. A solução foi tampada e deixada à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida a leitura espectrofotométrica foi realizada em 420 e 432 nm, utilizando como branco a solução redutora.

$$\%COHb = \frac{1 - (AR \times F1)}{AR (F2 - F1) - F3 + 1} \times 100 \quad \text{Sendo: } AR = \text{Abs } 420 / \text{Abs } 432$$

### 3.2.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NICOTINA E COTININA

A determinação da nicotina e da cotinina em plasma foi realizada por meio de cromatografia em fase gasosa (Agilent Technologies 6890N) com detector de nitrogênio/fósforo (CG-NPD) (MAN et al., 2006). Foram utilizados 150 µL de plasma diluído em 150 µL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0. O padrão interno utilizado foi o prolintano, previamente diluído em metanol, numa concentração final de 1 µg/mL.



As amostras foram submetidas à microextração em fase sólida com cartucho SPE BOND ELUT CERTIFY 130 mg (VARIAN) previamente condicionados com 2,0 mL de metanol e 2,0 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0. Em seguida, o cartucho foi lavado duas vezes com 3,0 mL água milli-Q e 3,0 mL HCl 0,1 M. Após sete minutos de secagem à vácuo (20mbar) foram adicionados 9,0 mL de metanol. A eluição foi realizada com solução de diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônio (12:3:0,3) recém preparado. Após secagem com N<sub>2</sub> o analito foi ressuspensionado com 50 µL de metanol para injeção de 2,0 µL no CG.

*Parâmetros Cromatográficos:* Temperatura de injeção: 250 °C; Modo de injeção splitless; Coluna: HP-5MS 30x0,25x0,1 (Agilent, Palo Alto, CA, EUA); Fluxo de Hélio: 1,2 mL/min; Forno: 100 °C, rampa 10 °C/min, temperatura final: 250 °C; Temperatura do detector: 300 °C.

### **3.3. ANÁLISE COMPORTAMENTAL**

#### **3.3.1. LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS**

O labirinto aquático de Morris consiste em um tanque circular de fibra de vidro (90 cm de diâmetro x 50 cm de altura) contendo água a 25° C ± 2° C até o nível de 44 cm. Uma plataforma circular (9 cm de diâmetro) em acrílico transparente foi colocada a 1 cm abaixo do nível da água. Adicionou-se leite para tornar a água opaca e dificultar a visualização da plataforma. O labirinto foi colocado em uma sala com painéis e outras pistas visuais na parede que servem de referência para que o animal localize a plataforma (Figura 6).

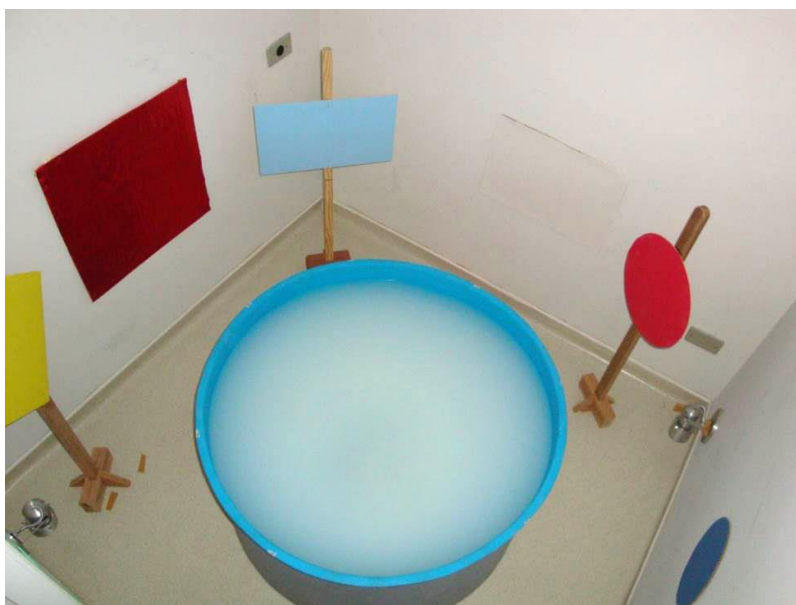


Figura 6: Sala com labirinto aquático de Morris e pistas visuais com diferentes luminosidades para que o animal localize a plataforma.

Os animais ( $n=12$ ) foram colocados no labirinto com o focinho voltado para a parede. O ponto de onde o animal foi liberado variou a cada dia e cada animal pode nadar por 60 segundos. Ao encontrar a plataforma, o animal permanecia no local por cerca de 10 segundos e caso não a encontrasse, era guiado gentilmente pelo experimentador até a plataforma, onde permanecia por 10 segundos (BERRY; MATTHEWS, 2004).

O labirinto foi dividido em quatro quadrantes imaginários e a localização da plataforma variou dependendo da tarefa realizada. Cada ensaio foi registrado com uma câmara digital posicionada acima do labirinto e o *software* EthoVision® (Noldus, The Netherlands) foi usado para avaliar a atividade de cada animal. O labirinto aquático de Morris foi utilizado para avaliar a memória de referência espacial e a memória operacional espacial, como descrito a seguir.

### 3.3.1.1. MEMÓRIA DE REFERÊNCIA ESPACIAL

Para avaliar a memória de referência espacial a plataforma foi mantida em uma única localização, no centro de um dos quadrantes em todas as tentativas e em todos os dias de treinamento. Durante a infância, cada animal foi treinado com uma sessão diária contendo quatro tentativas, por cinco dias (P20-24), totalizando 20 tentativas ao final dessa fase. Na adolescência e na fase adulta os animais foram treinados por dois dias (P37 a P38 e P67 a P68, respectivamente), totalizando oito tentativas em cada fase.

No dia seguinte à última sessão de treino em cada fase a plataforma foi retirada do labirinto e o animal foi submetido a 60 segundos de nado livre. O número de vezes em que o animal atravessou o local da plataforma, a distância percorrida e o tempo de permanência no quadrante alvo, bem como no contador (área quatro vezes maior que a plataforma, Figura 7) foram registrados.

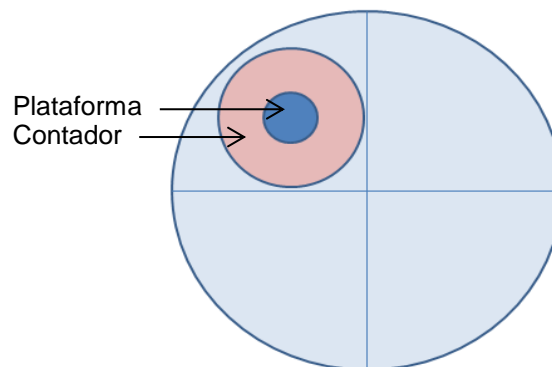


Figura 7: Esquema do labirinto aquático de Morris considerado para análise. Em azul escuro o local onde a plataforma estava nos dias de treino. Em rosa o contador (a região da plataforma está contida no contador).

### **3.3.1.2. MEMÓRIA OPERACIONAL ESPACIAL**

Para avaliar a memória operacional espacial a localização da plataforma variou a cada dia e o ensaio foi realizado em duas fases: Fase 1 - quatro tentativas por dia com intervalo de 10 minutos entre elas; e Fase 2 - quatro tentativas no dia sem intervalo entre elas (virtualmente zero).

Na Fase 1 cada animal foi treinado com uma sessão diária contendo quatro tentativas, por quatro dias (P26-29) na infância, enquanto na adolescência e na fase adulta cada animal foi treinado com uma sessão diária contendo quatro tentativas, por três dias (P40 a P42 e P70 a P72, respectivamente).

A Fase 2 foi realizada em apenas um dia, 24h após a Fase 1 em cada idade. Em ambas as Fases a distância percorrida até a plataforma foi o parâmetro utilizado para a análise.

### **3.3.2. CAMPO ABERTO**

A atividade geral dos animais foi avaliada por meio de observação direta dos mesmos em um campo aberto (uma arena circular de madeira com 40 cm de diâmetro e 50 cm de altura). Cada animal foi colocado, individualmente, no centro da arena do campo aberto e observado por um período de 10 minutos. Os parâmetros do repertório comportamental de um camundongo em campo aberto avaliados foram locomoção total, central e periférica.

O registro da atividade foi realizado com uma câmara digital e um sistema de captura de vídeo (Canopus<sup>®</sup>). O *software* EthoVision<sup>®</sup> (Noldus, The Netherlands) foi usado para quantificar a distância percorrida por cada animal.

Após cada observação, o campo aberto foi limpo com uma solução de álcool-água 5%, antes da introdução do próximo animal, a fim de evitar possíveis rastros de odor deixados pelo sujeito anterior. Para evitar efeitos circadianos no comportamento dos camundongos, as observações de todos os animais foram realizadas sempre no mesmo horário, às 8h.

### **3.3.3. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

O labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados de mesmo tamanho, porém, com paredes de 20 cm de altura. Os braços similares são cruzados em ângulo reto, conectados por uma área central. O aparelho foi elevado a 60 cm do chão. Foram avaliados o número de entradas em cada tipo de braço e o tempo gasto na exploração dos braços abertos e fechados (PELLOW et al., 1985). O teste em labirinto em cruz elevado foi realizado 24h após a realização do campo aberto.

A Figura 8 apresenta o desenho experimental dos ensaios comportamentais realizados neste trabalho.

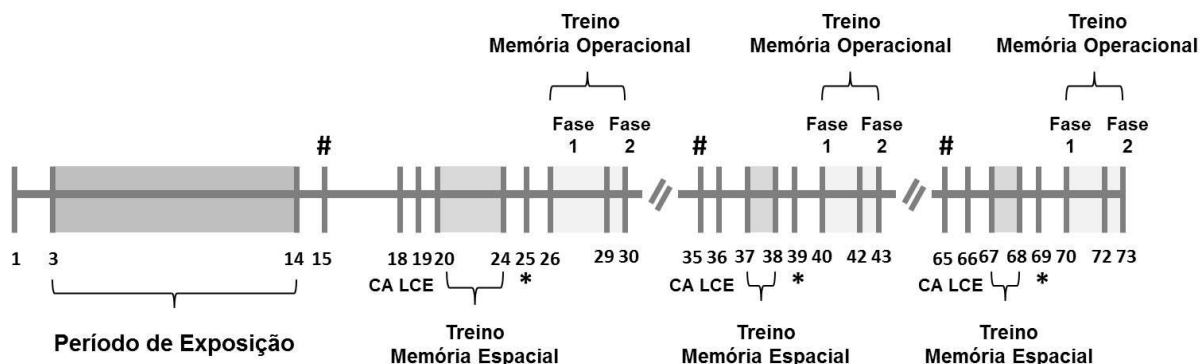


Figura 8: Desenho experimental dos ensaios realizados. Os animais foram expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal (P3 a P14). Os ensaios em campo aberto foram realizados na infância (P18), adolescência (P35) e na fase adulta (P65), enquanto o labirinto em cruz elevado foi realizado em P19, P36 e P66. O labirinto aquático de Morris foi utilizado para avaliar a memória de referência e operacional espacial. Para análise da memória de referência espacial os animais foram treinados durante cinco dias na infância (P20-P24) e dois dias na adolescência e fase adulta (P37-P38 e P67-P68, respectivamente) e submetidos ao teste (\*) sem a plataforma 24 horas após o treino em cada idade (P25, P39 e P69). Para análise da memória operacional espacial, os animais foram treinados durante quatro dias na fase 1 e um dia na fase 2 durante a infância e três dias na fase 1 e um dia na fase 2 durante a adolescência e fase adulta. Sendo: Fase 1 - quatro tentativas diárias com intervalo de 10 minutos entre elas e Fase 2 - quatro tentativas diárias sem intervalo entre elas (virtualmente zero). Para os ensaios bioquímicos diferentes animais foram eutanasiados (#) em P15, P35 e P65.

### 3.3.4. QUANTIFICAÇÃO DO BDNF

A quantificação do BDNF foi realizada por meio do kit BDNF Emax® ImmunoAssay System (Promega) e protocolo adaptado (SZAPACS et al., 2004). Adicionou-se 4 mL de tampão de lise [(100 mM PIPES (pH 7,0), 500 mM NaCl, 0,2% Triton X-100, 0,1% NaN<sub>3</sub>, 2% BSA, 2 mM EDTA.Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 200 µM PMSFe coquetel inibidor de protease 1:1000 (Sigma)] em cada tubo contendo as amostras. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado a -80 °C até o momento da análise.

A microplaca utilizada no ensaio foi revestida com 100  $\mu\text{L}$  de Anti-BDNFmAb diluído em tampão carbonato 0,025 M pH 9,7 (10  $\mu\text{L}$  de Anti-BDNFmAb e 9,99 mL de tampão de carbonato), selada e submetida à incubação *overnight* a 4 °C. Após incubação, o conteúdo dos poços foi removido e a microplaca lavada vigorosamente com tampão de lavagem TBS-t (Tris-HCl 20 mM pH 7,6; NaCl 150 mM; Tween® 20 0,05%). Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão Amostra & Block 1X em cada poço. A microplaca foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora e lavada com TBS-t.

Após o preparo da curva padrão de BDNF, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  dos padrões ou amostras em cada um dos poços. A microplaca foi selada e incubada por duas horas à temperatura ambiente sob agitação ( $400 \pm 100$  rpm). Posteriormente, a microplaca foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem TBS-t. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do anticorpo anti-humano BDNFpAb diluído (20  $\mu\text{L}$  do BDNFpAb anti-humano e 9,98 mL de tampão Amostra & Block 1X – diluição 1:500). A microplaca foi selada e incubada por duas horas à temperatura ambiente sob agitação. Após nova série de lavagens com tampão de lavagem TBS-t, foram adicionados cuidadosamente 100  $\mu\text{L}$  do anticorpo Anti-IgY HRP conjugado diluído (50  $\mu\text{L}$  do Anti-IgY HRP Conjugado e 9,95 mL de tampão Amostra & Block 1X – diluição 1:200). A microplaca foi novamente incubada por uma hora à temperatura ambiente sob agitação ( $400 \pm 100$  rpm) e então, submetida a cinco lavagens com tampão de lavagem TBS-t. Finalmente, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de TMB e a microplaca foi incubada à temperatura ambiente sob agitação durante 10 minutos. Em seguida foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico 1 M para interromper a reação. A leitura espectrofotométrica foi realizada à 450 nm.

### 3.3.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Animais de todos os grupos foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina 0,9% seguida de solução fixadora constituída de paraformaldeído 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Após a perfusão, os encéfalos foram coletados e armazenados em paraformaldeído 4% durante 4 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% em PB onde permaneceram até o momento do ensaio. Os tecidos foram cortados em uma espessura de 30  $\mu$ m em um micrótomo deslizando de congelamento. Os cortes foram selecionados e submetidos à metodologia de imuno-histoquímica com anticorpos específicos para detecção das proteínas sinápticas sinaptofisina e sinapsina I.

A realização da imuno-histoquímica foi realizada da seguinte forma: os cortes selecionados foram lavados em tampão fosfato (PB 0,1 M) por três vezes de 10 minutos, incubados com anticorpos primários específicos para os anticorpos citados acima na concentração 1:1000 em PB com 0,3% de Triton X-100 por um período de 14 a 18 horas à temperatura ambiente (24 °C). Os cortes foram então novamente lavados em tampão fosfato à temperatura ambiente e incubados por uma hora e meia com anticorpo secundário biotilado contra as imunoglobulinas do animal no qual foi feito o anticorpo primário. Após nova série de lavagens à temperatura ambiente, os cortes foram colocados por uma hora numa solução de Triton-X-100 0,3% em tampão fosfato 0,1 M com 0,4 M de NaCl, contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC ELITE kit, Vector Labs.). Após nova série de lavagens, os cortes foram imersos num meio contendo 3-3'diaminobenzidina (DAB- Sigma-Aldrich) 0,05% em tampão fosfato 0,1 M por cerca de 5 minutos. Acrescentou-se 3



mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,3% em água destilada, mantendo-se os cortes neste banho até que a reação fosse evidenciada. Atingida a imunorreatividade desejada com o desenvolvimento de coloração marrom clara, os cortes foram removidos da solução com DAB e imersas em tampão PB 0,1 M. Depois de nova série de lavagens em tampão fosfato 0,1 M com o objetivo de remoção do excesso de reagente, os cortes foram colocados sobre lâminas de vidro gelatinizadas e colocadas em placa quente para secarem. Em seguida, os cortes foram hidratados em água destilada por 1 minuto, banhados em solução de tetróxido de ósmio 0,1% por 15 a 30 segundos, desidratados por uma série de álcoois em concentrações crescentes, clareadas com Hemo-De (Fisher) e cobertas com lamínulas, tendo como meio de montagem o Permount (Sigma). O material obtido foi analisado em microscópio óptico equipado em campo claro escuro e contraste de interferência diferencial (Normaski). Foram coletadas três imagens digitais de cada amostra ( $n=5$ ), as quais foram obtidas por meio de uma câmera de vídeo acoplada a um microscópio Nikon. A quantificação foi realizada com o programa ImageJ (1.43u, *National Institutes of Health*), sendo avaliados a intensidade integrada em três campos de cada micrografia. Os dados foram expressos em razão da intensidade integrada da região marcada pelo fundo da imagem.

### **3.3.6. IMMUNOBLOTTING**

Para realização de *immunoblotting* os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o encéfalo foi rapidamente retirado e mergulhado em solução fria de tampão salina-fosfato. As estruturas encefálicas foram retiradas

sobre uma placa de petri gelada coberta por papel de filtro embebido em solução salina gelada e congelado em gelo seco. As amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C até o momento do ensaio.

As amostras foram homogeneizadas com tampão Tris-HCl 50 mM [Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo 1,0 mM de PMSF e coquetel inibidor de protease 1:1000 (Sigma)] na diluição 1:2 e centrifugados durante 5 minutos a 1000 g e a 4 °C. Todas as amostras foram ajustadas para a mesma concentração proteica (5,0 µg/µL) pelo método de Bradford, por meio de diluição com Tris-HCl 50 mM. Em seguida, 130 µL da amostra foram diluídos com 30 µL de tampão de Laemmli (0,0625 M de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de 2-mercaptoetanol). Após centrifugação a 1000 g por 1 minuto, quantidades variáveis de proteína (sinapsina I: 10 µg; sinaptofisina e PBM: 50 µg) foram separadas por eletroforese em gel de policrilamida (15% para sinapsina I e sinaptofisina e 17% para PBM) contendo lauril sulfato de sódio a 0,1% (SDS – PAGE) conforme originalmente descrito (LAEMMLI, 1970).

Para a separação eletroforética das proteínas, foi utilizado tampão composto por 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS pH 8,3 e intensidade de voltagem constante de 120 V. Posteriormente, as bandas proteicas foram transferidas eletroforéticamente por meio de sistema submerso para membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,45 µm) durante 90 minutos (180 mA, ≅ 40 V). A composição do tampão empregado para a transferência eletroforética de proteínas para a membrana de nitrocelulose foi: 25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e 18% (V/V) de etanol absoluto. Para comprovar a eficiência da transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (0,1% em mistura de ácido acético 30% e ácido sulfossalicílico 30%). Após lavagem rápida das

membranas para retirada do excesso de corante com tampão TBS-t (20 mM de Tris-HCl, 137 mM de NaCl pH 7,4, contendo 0,1% de Tween-20), os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução de caseína 5,0% em tampão TBS-t, sob agitação constante durante 90 minutos.

Após lavagem tampão TBS-t, as membranas foram incubadas durante 15 a 18 horas, de 2 a 8 °C com anticorpos primários específicos: rabbit policlonal anti-sinapsina 1:1000 (Millipore, Temecula, EUA), mouse monoclonal anti-sinaptofisina, 1:1000 (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) e rabbit policlonal anti-PBM 1:500 (Millipore, Temecula, EUA), diluídos em tampão TBS-t. Após o término da incubação, as membranas foram lavadas (6 vezes durante 10 minutos cada) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpos secundários conjugados a enzimas – anticorpo policlonal anti-rabbit ou anti-mouse+AP (1:3000) – com caseína 3,0% durante 2 horas.

As membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens com TBS-t, e as bandas imunorreativas foram reveladas por incubação com substratos específicos para as enzimas conjugados aos anticorpos secundários, cujas reações envolvem emissão de quimioluminescência. As imagens foram detectadas (ImageQuant 400, GE Healthcare) e digitalizadas (IQuantCapture 400, v.1.0.0, GE Healthcare) e as intensidades das bandas imunorreativas foram comparadas pelo programa ImageJ (1.43u, *National Institutes of Health*) e expressas em unidades arbitrárias. A razão entre a densitometria das bandas de sinapsina I, sinaptofisina ou PBM e a densitometria das bandas de  $\beta$ -actina (controle interno) foi utilizada como fator normalizador. A Figura 9 representa membranas obtidas no *immunoblotting* para sinapsina I, sinaptofisina e PBM.

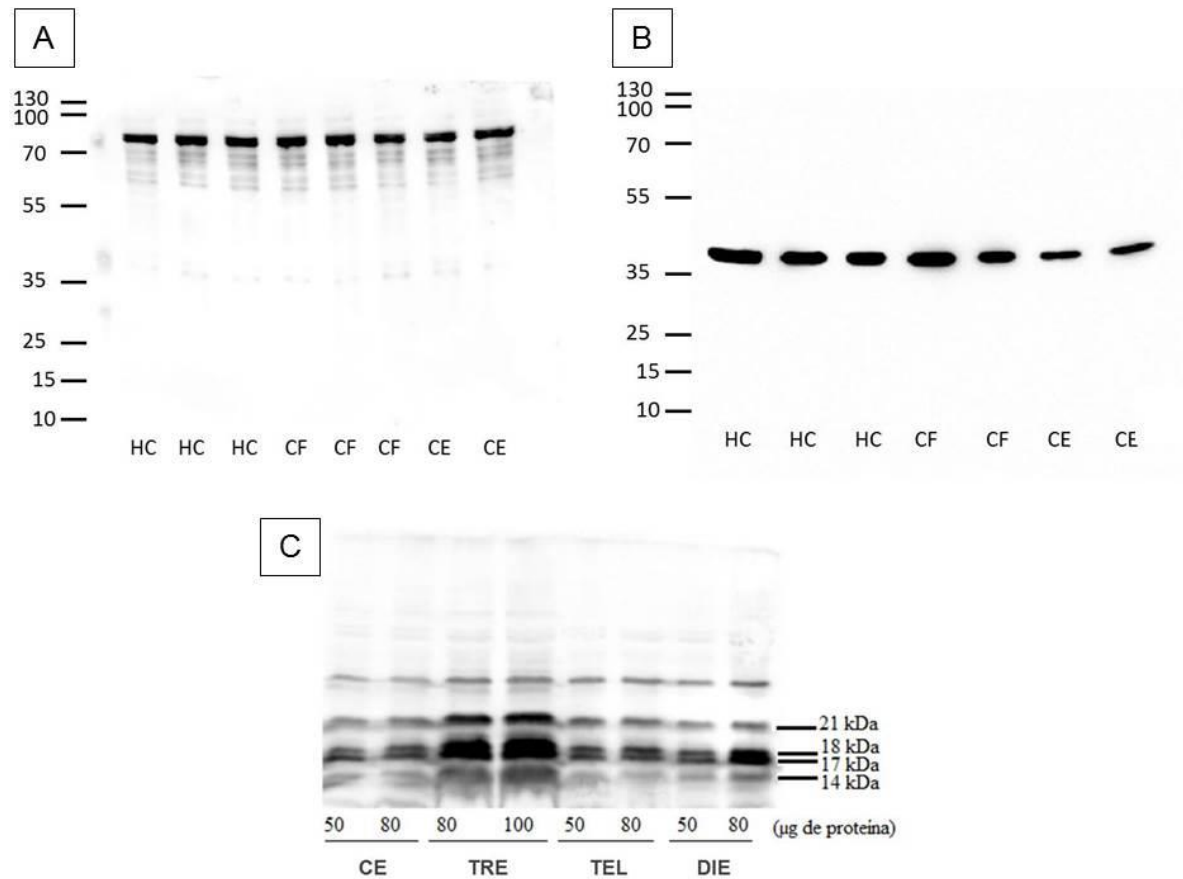


Figura 9: Representação de membranas obtidas na padronização de *immunoblotting* para (A) sinapsina I (78 kDa), (B) sinaptofisina (38 kDa) e (C) PBM (14, 17, 18 e 21 kDa) em gel de poliacrilamida de 15% (sinapsina I e sinaptofisina) e de 17% (PBM) para diversas estruturas do SNC. HC: hipocampo; CF: córtex pré-frontal; CE: cerebelo; TRE: tronco encefálico; TEL: telencéfalo; DIE: diencéfalo.

Vale destacar que a quantificação da PBM foi realizada em regiões encefálicas que apresentam diferentes razões entre as substâncias branca e cinzenta: cerebelo, telencéfalo, diencéfalo e tronco encefálico (FERNÁNDEZ et al., 2010).

### 3.3.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os nervos ópticos foram coletados e armazenados em glutaraldeído 2% e mantido sob refrigeração (5 °C) até o momento das análises.

As amostras foram lavadas 3 vezes com PBS (tampão salina-fosfato) por 3 minutos para a retirada do glutaraldeído. Imediatamente após a lavagem as amostras foram pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio 2% e sacarose 10,56% em água durante duas horas e coradas com solução de acetato de uranila 0,5% e sacarose 10,56% em água *overnight*. A desidratação foi realizada em séries crescentes de etanol (de 70% a etanol absoluto). Então, o material foi embebido duas vezes em óxido de propileno por 10 minutos. As amostras foram deixadas em uma mistura de resina e óxido de propileno (1:1) por oito horas sob agitação lenta e constante e durante 6 horas em resina Spurr para completa infiltração. Em seguida, foram colocadas em resina Spurr e deixadas à 72°C por 30 horas para polimerização.

Para a análise da área do nervo óptico foram realizadas secções semi-finas de 400 nm de espessura corados com azul de toluidina a 2%. As imagens foram analisadas em microscópio óptico [Axioplan II, Carl-Zeiss equipado com x 5,0/0,30 Plan-neofluar ou x 10,0/0,25 Achroplan objetivas/abertura numérica de x 1,0, 1,25 ou 1,60 (optovar)], e capturadas em câmera de vídeo (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss). A análise da área dos nervos ópticos foi realizada por meio do software AxioVs40 v4.8. Os dados foram expressos em  $\mu\text{m}^2$  (média  $\pm$  EPM).

Para a análise ultra-estrutural foram realizadas secções ultra-finas (70 nm de espessura), colhidas em telas de cobre de 200 mesh, coradas com acetato de uranila e nitrato do chumbo. As amostras foram visualizadas em microscopia

eletrônica de transmissão (JEOL-1010) e foram confeccionadas micrografias eletrônicas (AMT v2.25.5 for Kodak 14I). A contagem das fibras mielínicas e amielínicas foi realizada em 40 campos aleatórios de forma cega em relação ao grupo, com o auxílio do software Image-Pro Plus (v4.5.0.29). Os dados foram expressos em porcentagem de fibras mielínica (média  $\pm$  EPM).

### 3.3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nas análises realizadas em labirinto aquático de Morris, em campo aberto e em labirinto em cruz elevado, os grupos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguido do teste *post-hoc* Bonferroni.

Para a análise do peso dos animais, da área e da porcentagem de fibras mielinizadas no nervo óptico, os dados foram comparados por meio de ANOVA, seguido do teste *post-hoc* Student-Newman-Keuls.

Nos ensaios de *immunoblotting*, imuno-histoquímica e BDNF os grupos controle e fumante foram comparados pelo teste “t” de Student para amostras não pareadas.

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) e considerados significativamente diferentes para valores de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. MONITORIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos na determinação da quantidade de monóxido de carbono na câmara durante a exposição, da concentração de COHb em sangue total e da concentração de nicotina e cotinina em plasma dos animais expostos à fumaça do cigarro ( $n=6$ ).

Tabela 2: Determinação da concentração de CO durante a exposição, da COHb em sangue total e da nicotina e cotinina no plasma de animais expostos à fumaça do cigarro (3R4F). Dados expressos como média  $\pm$  EPM.

	CO (ppm)	COHb (%)	Nicotina (ng/mL)	Cotinina (ng/mL)
Controle	Não detectado	1,5 $\pm$ 0,2	Não detectado	Não detectado
Tratado	361,8 $\pm$ 77,3	12,5 $\pm$ 1,9	126,1 $\pm$ 17,2	100,8 $\pm$ 14,5

#### 4.1.1. PESO

A Figura 10 mostra que animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal apresentam ganho de peso estatisticamente significativo menor em relação ao controle na infância e na adolescência ( $p<0,001$  e  $p<0,01$ , respectivamente). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos controle e fumante na fase adulta. Contudo, houve aumento no ganho de peso estatisticamente significativo nos grupos controle e fumante na



adolescência ( $p<0,001$ ) e na fase adulta ( $p<0,001$ ) em relação à infância e na na fase adulta em relação à adolescência ( $p<0,001$ ).

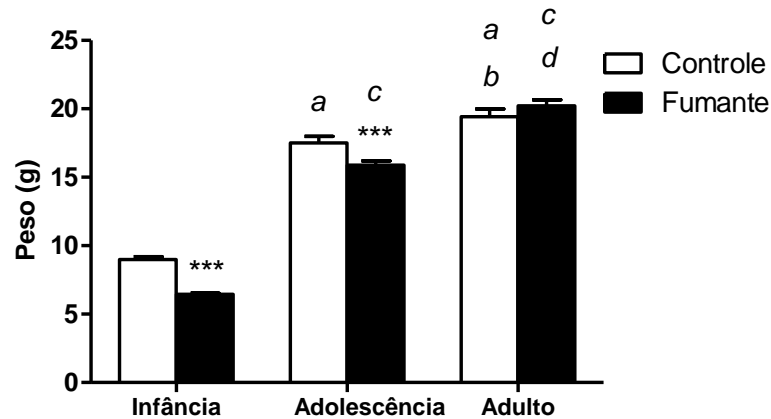


Figura 10: Representação do peso de animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal em comparação ao controle em diversas fases do desenvolvimento. Dados expressos em gramas (média  $\pm$  EPM). ANOVA, seguido do teste *post-hoc* Student-Newman-Keuls. \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . (a)  $p<0,001$  – adolescentes CT e adultos CT vs. infância CT. (b)  $p<0,001$  – adultos CT vs. infância CT (c)  $p<0,001$  – adolescentes FU e adultos FU vs. infância FU. (d)  $p<0,001$  – adultos FU vs. infância FU. FU: animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal; CT: animais do grupo controle.

## **4.2. ANÁLISE COMPORTAMENTAL E PROTEÍNAS SINÁPTICAS**

### **4.2.1. LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS**

#### **4.2.1.1. MEMÓRIA DE REFERÊNCIA ESPACIAL**

##### **4.2.1.1.1. TREINO**

Durante o treino para avaliar a memória espacial em labirinto aquático de Morris foi possível observar que os animais expostos à fumaça do cigarro percorreram uma distância maior para encontrar a plataforma quando comparados aos controles, como pode ser visto na Figura 11. Os resultados demonstram que houve efeito estatístico para tratamento, sexo e idade, além de interação entre tratamento e idade. Durante a infância, tanto em P20 quanto em P22, P23 e P24, houve aumento estatisticamente significativo da distância percorrida até a plataforma em fêmeas e machos expostos à fumaça do cigarro em relação aos controles ( $p < 0,001$ ). Nenhuma diferença estatística entre controles e fumantes foi observada em P21, ou mesmo na adolescência e na fase adulta. Contudo, houve diminuição estatisticamente significativa da distância percorrida até a plataforma nos animais adolescentes e adultos expostos à fumaça do cigarro em relação à infância, enquanto nos grupos controles apenas os adultos mostraram diminuição estatisticamente significativa da distância percorrida quando comparados à infância (Figura 11).

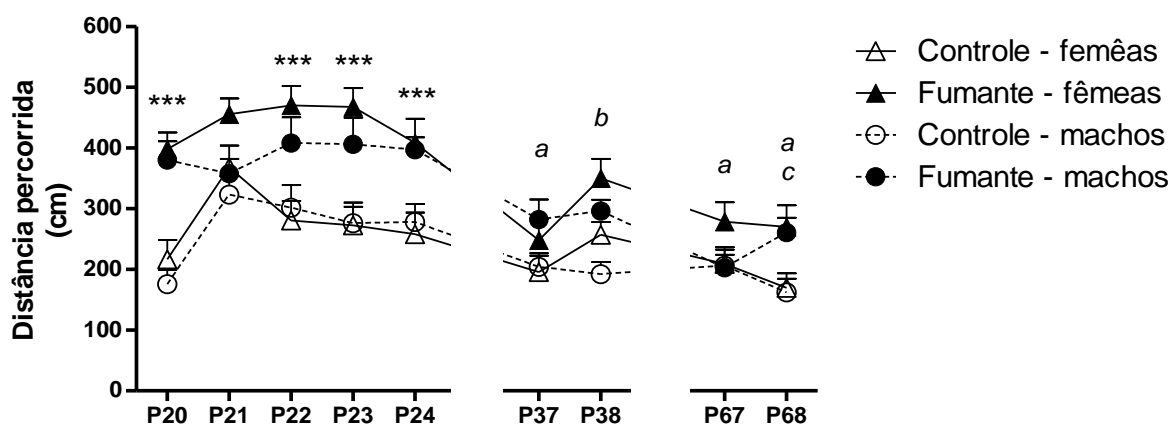


Figura 11: Distância percorrida até a plataforma durante o treino para avaliar memória de referência espacial em labirinto aquático de Morris. Os animais foram treinados durante cinco dias na infância (P20-P24) e dois dias na adolescência e na fase adulta (P37-P38, P67-P68, respectivamente). Dados expressos em cm, média  $\pm$  EPM ( $n=12$ ). ANOVA para medidas repetidas, seguido do teste *post-hoc* Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$  – animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal (P3 a P14) em relação aos controles; (a)  $p < 0,05$  – adolescentes FU e adultos FU em relação à infância FU (P20-P24); (b)  $p < 0,05$  – adolescentes FU em relação à infância FU (P20-P23); (c)  $p < 0,05$  – adultos CT em relação à infância CT (P21-P23). FU: animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal; CT: animais do grupo controle.

#### 4.2.1.1.2. TESTE

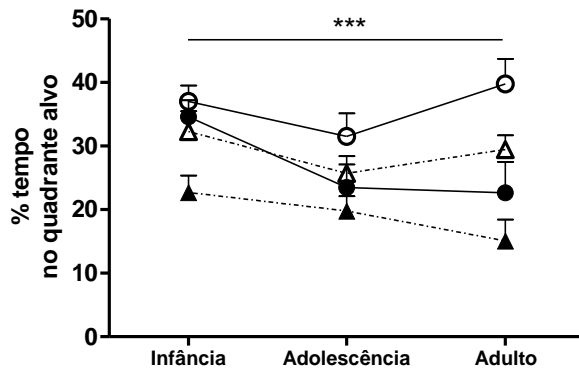
No teste para avaliar a memória de referência espacial, foi usada ANOVA de 3 vias para medidas repetidas (tratamento x sexo x idade). Houve efeito estatístico para tratamento e sexo na maioria dos parâmetros avaliados, com exceção da distância percorrida no contador, em que não houve efeito estatístico para sexo (Figura 12D). Contudo, não houve interação entre tratamento e sexo ou mesmo entre tratamento e idade (Figura 12).

Os animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal apresentaram diminuição estatisticamente significativa no tempo de permanência e na distância percorrida no quadrante alvo ( $p < 0,001$ ) e no contador ( $p < 0,001$ ) em relação aos controles (Figura 12A a 12D). Ainda, houve diminuição estatisticamente significativa do número de vezes que os animais expostos à fumaça do cigarro atravessaram o local da plataforma em relação aos controles ( $p < 0,001$ ) (Figura 12E).

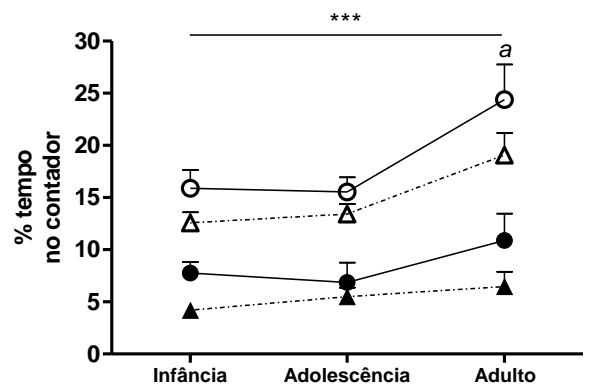
Nossos resultados também indicam efeito estatístico para idade no tempo de permanência no quadrante alvo e no tempo de permanência e na distância percorrida no contador. Assim, foi realizada uma ANOVA-1 via para medidas repetidas que revelou que animais adultos do grupo controle apresentaram aumento no tempo de permanência ( $p < 0,05$ ) e na distância percorrida ( $p < 0,01$ ) no contador em relação à infância e à adolescência (Figura 12B e 12D), enquanto os animais adultos expostos à fumaça do cigarro apresentaram apenas aumento na distância percorrida no contador em relação à infância e à adolescência ( $p < 0,05$ ) (Figura 12D).

Ainda, houve diminuição estatisticamente significativa no tempo de permanência e na distância percorrida no quadrante alvo, no tempo de permanência no contador e no número de vezes que os animais atravessaram o local da plataforma pelas fêmeas em relação aos machos ( $p < 0,05$ ) (Figura 12A a 12C).

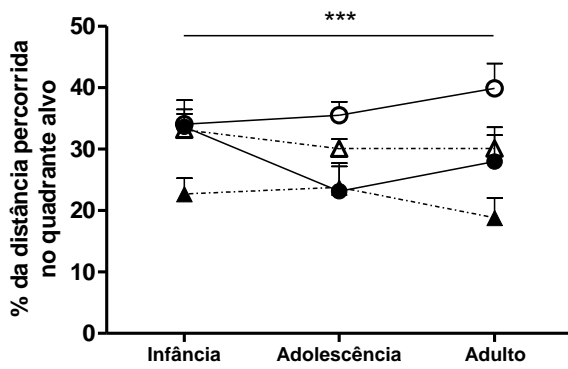
A



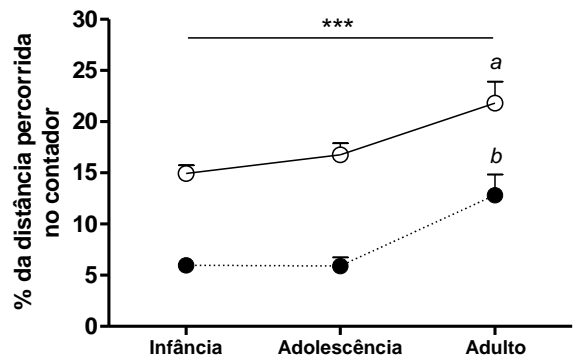
B



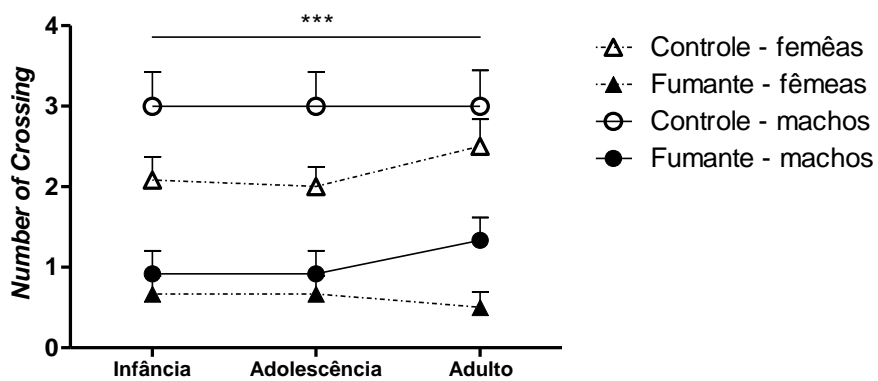
C



D



E



- △- Controle - fêmeas
- ▲- Fumante - fêmeas
- Controle - machos
- Fumante - machos

Figura 12: Teste de memória de referência espacial em labirinto aquático de Morris na infância (P25), adolescência (P39) e na fase adulta (P69). A – Tempo no quadrante alvo ( $n=12$ ); dados expressos em porcentagem de tempo de permanência dos animais no quadrante alvo em relação ao tempo total no labirinto (média  $\pm$  EPM). B – Tempo no contador ( $n=12$ ); dados expressos em porcentagem de tempo de permanência dos animais no contador em relação ao tempo total no labirinto (média  $\pm$  EPM); (a) – animais controle adultos em relação à infância e adolescência ( $p<0,05$ ). C – Distância percorrida no quadrante alvo ( $n=12$ ); dados expressos em porcentagem da distância percorrida pelos animais no quadrante alvo em relação à distância total percorrida no labirinto (média  $\pm$  EPM). D – Distância percorrida no contador ( $n=24$ ); dados expressos em porcentagem da distância percorrida pelos animais no contador em relação à distância total percorrida no labirinto (média  $\pm$  EPM); (a) – animais controle adultos em relação à infância ( $p<0,01$ ) e adolescência ( $p<0,05$ ); (b) – animais expostos à fumaça do cigarro adultos em relação à infância e adolescência ( $p<0,01$ ). E – Número de vezes que os animais atravessaram o local da plataforma ( $n=12$ ); dados expressos em números absolutos (média  $\pm$  EPM). \*\*\* $p<0,001$  – animais expostos à fumaça do cigarro em relação aos controles. ANOVA para medidas repetidas, seguido do teste *post-hoc* Bonferroni.

#### 4.2.1.2. MEMÓRIA OPERACIONAL ESPACIAL

No teste para avaliar a memória operacional espacial, foi usada ANOVA para medidas repetidas considerando tratamento, sexo, idade e tentativa.

Na Fase 1, em que o intervalo entre as tentativas foi de 10 minutos, os dados estão representados por média das tentativas 1-4 durante os 4 dias de teste na infância e os 3 dias na adolescência e na fase adulta. Como houve efeito estatístico para idade, foi realizada uma ANOVA para medidas repetidas considerando tratamento, sexo e tentativa para cada idade (Figura 13A a 13C). Nossos resultados demonstram efeito estatístico para tratamento na infância e na adolescência, além de interação entre tratamento e tentativa na adolescência.

Os animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal apresentaram diminuição estatisticamente significativa na distância percorrida até a

plataforma em relação aos controles na infância e na adolescência ( $p < 0,001$ ) (Figura 13A e 13B). Nossos resultados também demonstram que, na adolescência, animais controles apresentam diminuição estatisticamente significativa na distância percorrida até a plataforma na 4ª tentativa em relação à 1ª tentativa ( $p < 0,01$ ) e aos animais expostos à fumaça do cigarro em todas as tentativas ( $p < 0,05$ ). Nenhuma diferença estatística foi observada na fase adulta (Figura 13C).

Na Fase 2, em que o intervalo entre as tentativas foi virtualmente zero, também foi usada ANOVA medidas repetidas considerando tratamento, sexo, idade e tentativa. Houve efeito estatístico apenas para tentativas e nenhuma diferença estatística entre animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal e controles foi observada (Figura 13 D).

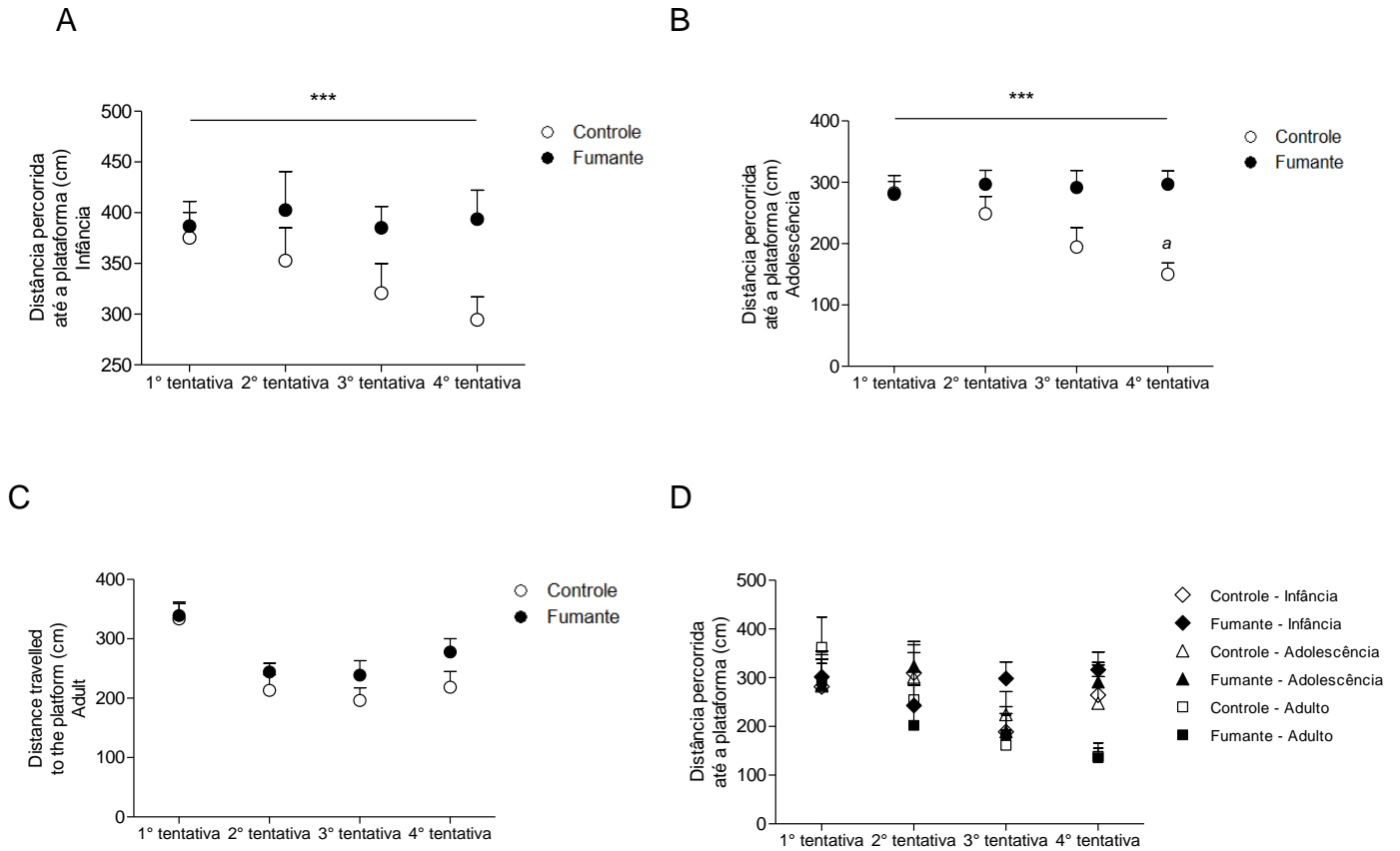


Figura 13: Distância percorrida até a plataforma no teste para avaliar a memória operacional espacial em labirinto aquático de Morris. Dados expressos em cm (média  $\pm$  EPM). Fase1 ( $n=24$ ): A – Infância (P25-28); B – Adolescência (P40-42); C – Adulto (P70-72). Dados representam a média das tentativas 1-4 durante os 4 dias de teste na infância e os 3 dias na adolescência e fase adulta. \*\*\* $p < 0,001$  – animais expostos à fumaça do cigarro comparados aos controles. (a) – animais controles na 4ª tentativa em relação à 1ª tentativa ( $p < 0,01$ ) e em relação aos animais expostos à fumaça do cigarro em todas as tentativas ( $p < 0,01$ ). Fase 2 ( $n=12$ ) – (D) Dados representam a média das tentativas 1-4 no dia do teste na infância (P29), adolescência (P43) e fase adulta (P73).

#### 4.2.2. CAMPO ABERTO

Na locomoção total (LT) avaliada em campo aberto observamos efeito estatístico para tratamento, sexo e idade, sendo que houve interação apenas entre tratamento e idade (Figura 14). Observamos diminuição estatisticamente



significativa da locomoção total dos animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal quando comparados aos controles na infância ( $p < 0,001$ ) e na adolescência ( $p < 0,05$ ). Ainda, os resultados mostram aumento estatisticamente significativo na LT dos animais expostos à fumaça do cigarro na fase adulta em relação à infância e à adolescência ( $p < 0,001$ ), além de diminuição estatisticamente significativa na LT nos animais controles na adolescência em relação aos controles na infância ( $p < 0,001$ ).

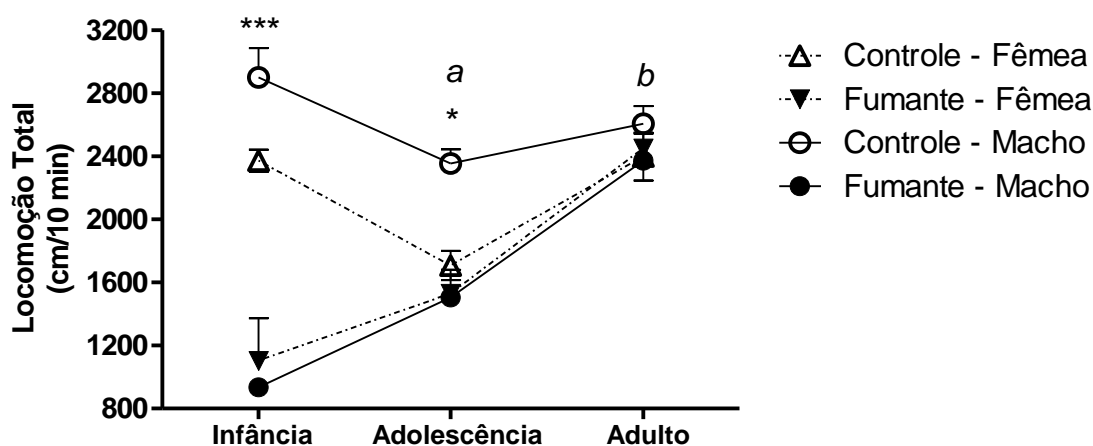


Figura 14: Locomoção total em campo aberto em diferentes idades ( $n=12$ ). Animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal em comparação ao controle. Dados expressos em cm percorridos em 10 minutos (média  $\pm$  EPM). ANOVA para medidas repetidas, seguido do teste *post-hoc* Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$  em relação ao CT da mesma idade. (a)  $p < 0,001$  – infância CT vs. adolescentes CT. (b)  $p < 0,001$  – adultos FU vs infância FU e adolescentes FU. FU: animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal; CT: animais do grupo controle.

Em relação à distância percorrida na zona central observamos efeito estatístico para tratamento, sexo e idade, sendo que houve interação entre idade e tratamento e entre idade e sexo (Figura 15). Observamos diminuição estatisticamente significativa da locomoção central (LC) dos animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal quando comparados aos controles

na infância ( $p<0,001$ ) e na adolescência ( $p<0,05$ ). Os resultados também mostram aumento estatisticamente significativo na LC dos animais, tanto fumante quanto controle, na adolescência em relação à infância ( $p<0,001$ ), e na fase adulta em relação à infância e à adolescência ( $p<0,001$ ).

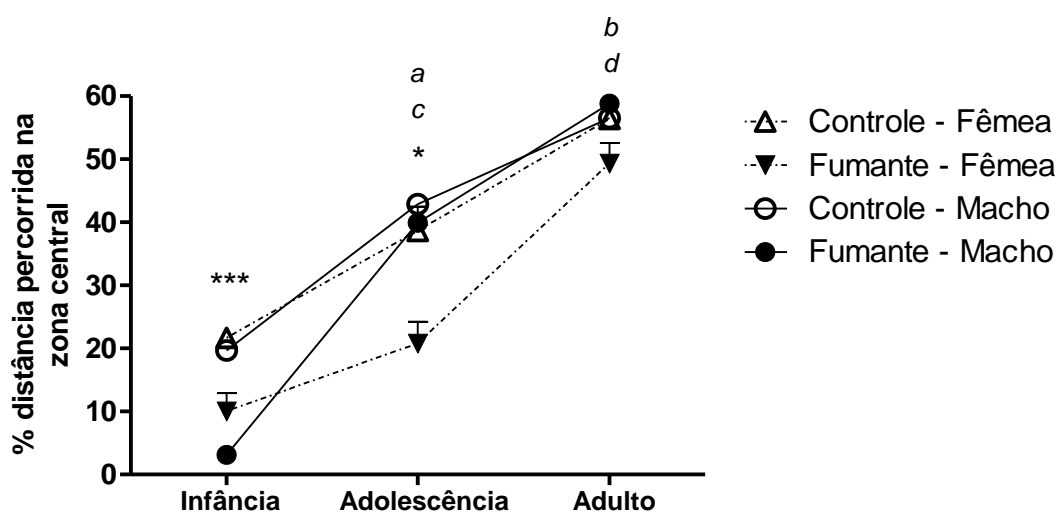


Figura 15: Porcentagem de distância percorrida na zona central do campo aberto em relação à LT em diferentes idades. Animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal em comparação ao controle. Dados expressos em % da LT em relação ao controle (média  $\pm$  EPM). ANOVA para medidas repetidas, seguido do teste *post-hoc* Bonferroni. \*\*\* $p<0,001$ ; \* $p<0,05$  FU em relação ao CT da mesma idade. (a)  $p<0,001$  – infância CT vs. adolescentes CT. (b)  $p<0,001$  – adultos CT vs infância CT e adolescentes CT. (c)  $p<0,001$  – infância FU vs. adolescentes FU. (d)  $p<0,001$  – adultos FU vs infância FU e adolescentes FU. FU: animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal; CT: animais do grupo controle.

#### 4.2.3. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

A Figura 16 mostra a porcentagem de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas nos braços do labirinto, enquanto na Figura 17

observamos a porcentagem da distância percorrida nos braços abertos em relação à LT em diferentes idades.

Na análise da porcentagem de entradas nos braços abertos houve efeito estatístico apenas para tratamento, enquanto na porcentagem da distância percorrida houve efeito estatístico para tratamento e idade. Contudo, não houve nenhuma interação estatística.

Os resultados mostram diminuição estatisticamente significativa na porcentagem de entradas e na distância percorrida nos braços abertos pelos animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal em comparação aos controles ( $p < 0,001$ ). Ainda, observamos aumento na porcentagem da distância percorrida na adolescência e na fase adulta ( $p < 0,001$ ).

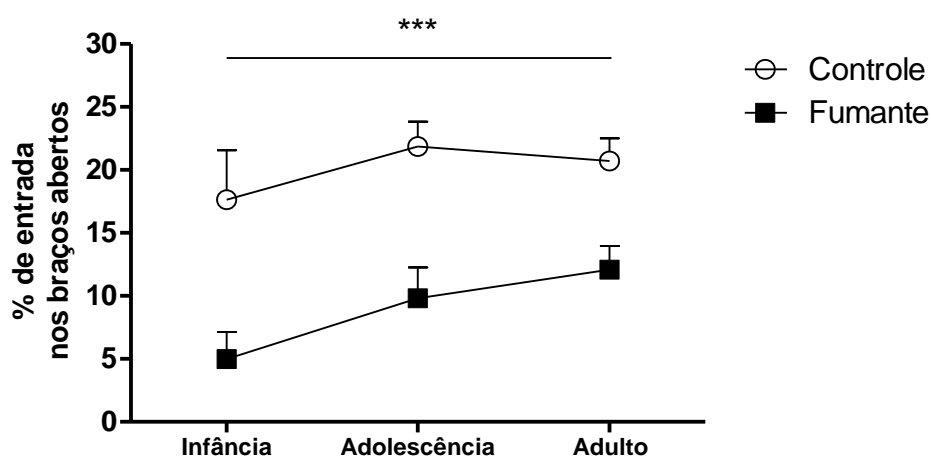


Figura 16: Porcentagem do número de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas nos braços do labirinto em diferentes idades. Animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal em comparação ao controle. Dados expressos em % do número de entradas nos braços abertos em ao número de entradas em ambos os braços do labirinto (média  $\pm$  EPM). ANOVA para medidas repetidas, seguido do teste *post-hoc* Bonferroni.

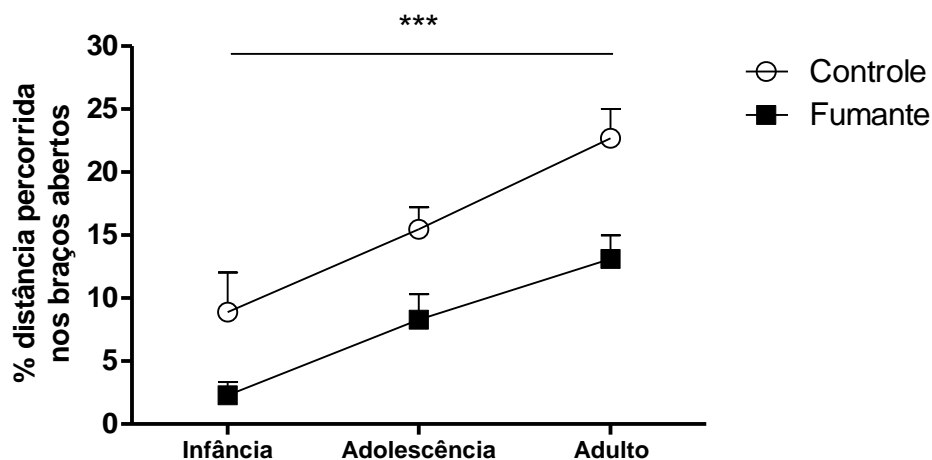


Figura 17: Porcentagem da distância percorrida nos braços abertos em relação em relação à LT em diferentes idades. Animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal em comparação ao controle. Dados expressos em % da distância percorrida em relação ao controle (média  $\pm$  EPM). ANOVA para medidas repetidas, seguido do teste *post-hoc* Bonferroni.

#### 4.2.4. BDNF

Na Figura 18 é possível observar a quantificação do níveis de BDNF no hipocampo, no cerebelo, no córtex pré-frontal e no estriado durante a infância (18A), adolescência (18B) e fase adulta (18C). Houve diminuição estatisticamente significativa da quantidade de BDNF no hipocampo ( $p < 0,05$ ), córtex pré-frontal ( $p < 0,001$ ) e no estriado ( $p < 0,01$ ) de animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal em relação aos controles na infância. Nenhuma diferença estatística foi observada na adolescência e na fase adulta.

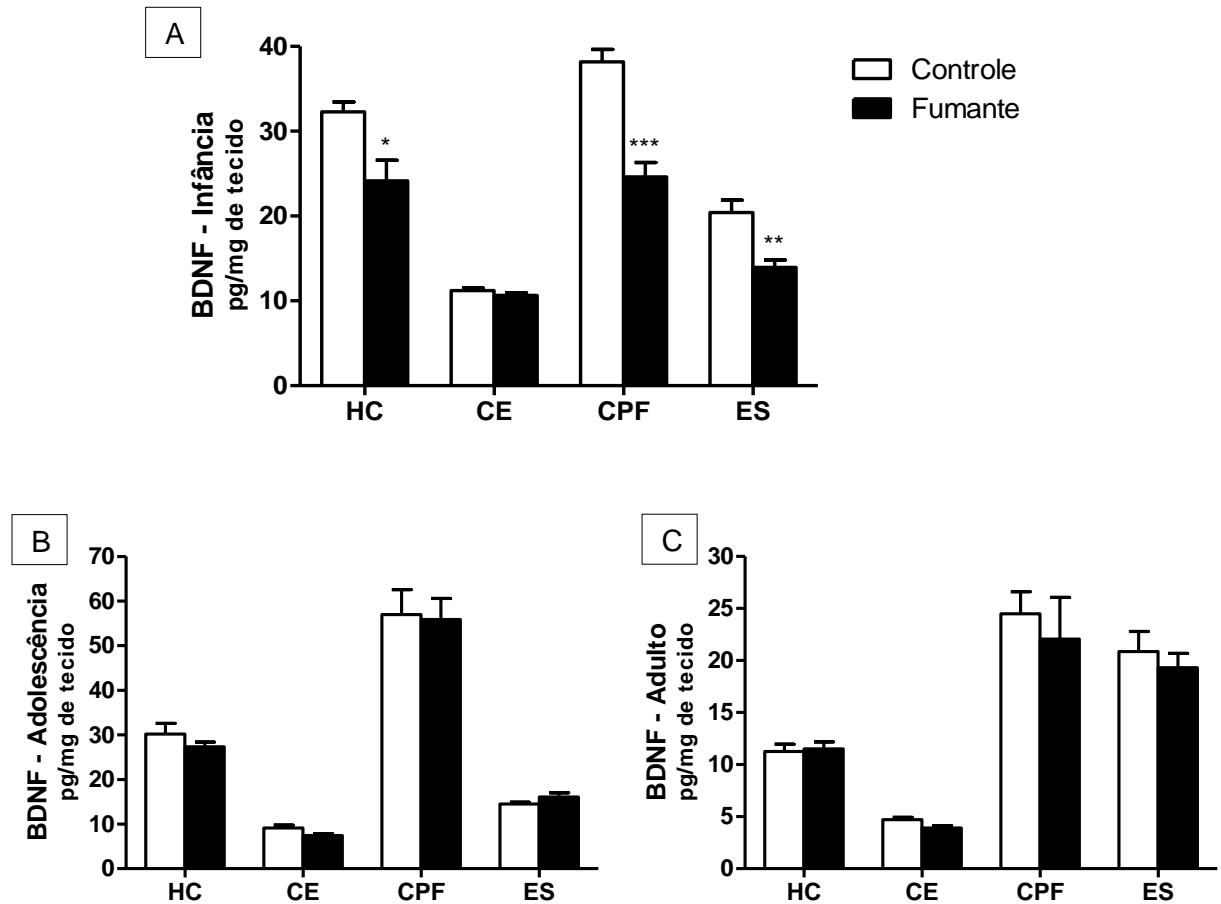


Figura 18: Quantificação de BDNF por meio do kit BDNF Emax® ImmunoAssay System (Promega) no hipocampo (HC), cerebelo (CE), córtex pré-frontal (CPF) e estriado (ES) de animais na infância (A), adolescência (B) e fase adulta (C). Animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F no início do período pós-natal em comparação ao controle. Dados expressos em  $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$  de tecido (média  $\pm$  EPM). Teste “t” de Student para amostras não pareadas. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### **4.2.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA e IMMUNOBLOTTING**

##### **4.2.5.1. INFÂNCIA**

A Figura 19 ilustra a imunorreatividade de sinapsina I no hipocampo, cerebelo, córtex pré-frontal e estriado na infância, enquanto a Figura 20 apresenta a quantificação de sinapsina I por meio de imuno-histoquímica nas diferentes estruturas. Pode-se observar diminuição estatisticamente significativa no hipocampo ( $p < 0,05$ ) e no córtex pré-frontal ( $p < 0,05$ ) de animais de 15 dias expostos à fumaça do cigarro 3R4F em comparação ao controle. Nenhuma diferença foi observada no cerebelo e no estriado.

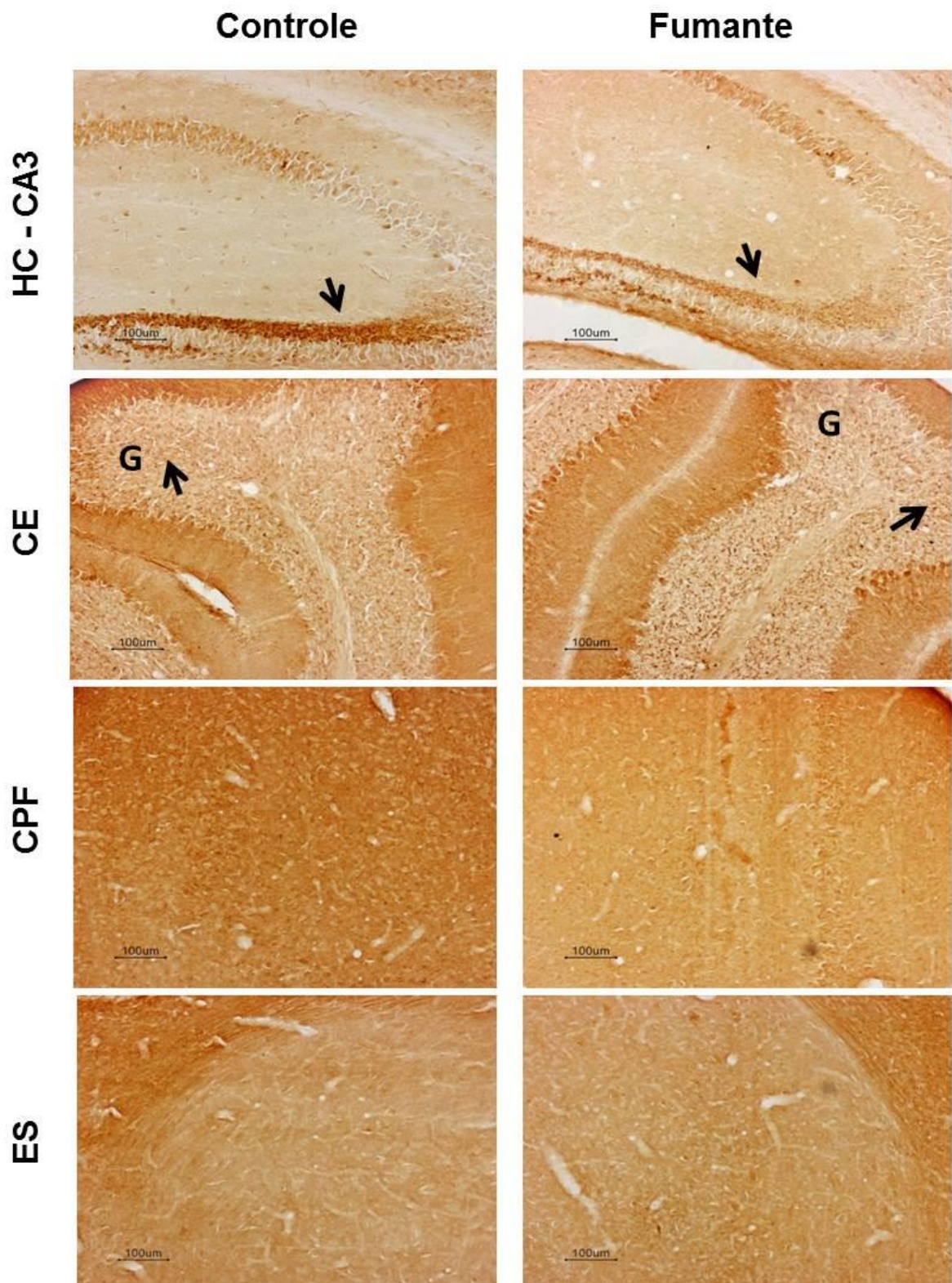


Figura 19: Micrografias ilustrando a imunorreatividade da sinapsina I na região CA3 do hipocampo (HC), no cerebelo (CE), no córtex pré-frontal (CPF) e no estriado (ES) de animais de 15 dias dos grupos controle e expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal. G: camada granular do cerebelo.

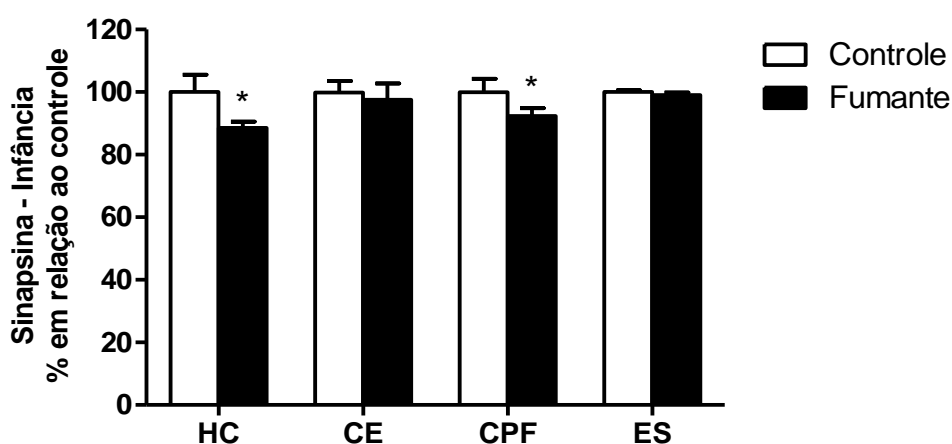


Figura 20: Quantificação de sinapsina I no hipocampo (HC), cerebelo (CE), córtex pré-frontal (CPF) e estriado (ES) por imuno-histoquímica em animais de 15 dias expostos à fumaça do cigarro em comparação ao controle. Dados expressos em % em relação ao controle (média  $\pm$  EPM). Teste “t” de Student para amostras não pareadas. \* $p < 0,05$ .

A Figura 21 apresenta o resultado obtido na quantificação da sinapsina I por *immunoblotting* em animais de 15 dias. Pode-se observar que a fumaça do cigarro induziu diminuição estatisticamente significativa da sinapsina I no hipocampo ( $p < 0,01$ ), no cerebelo ( $p < 0,05$ ) e no estriado ( $p < 0,05$ ). Nenhuma diferença estatística foi observada no córtex pré-frontal.



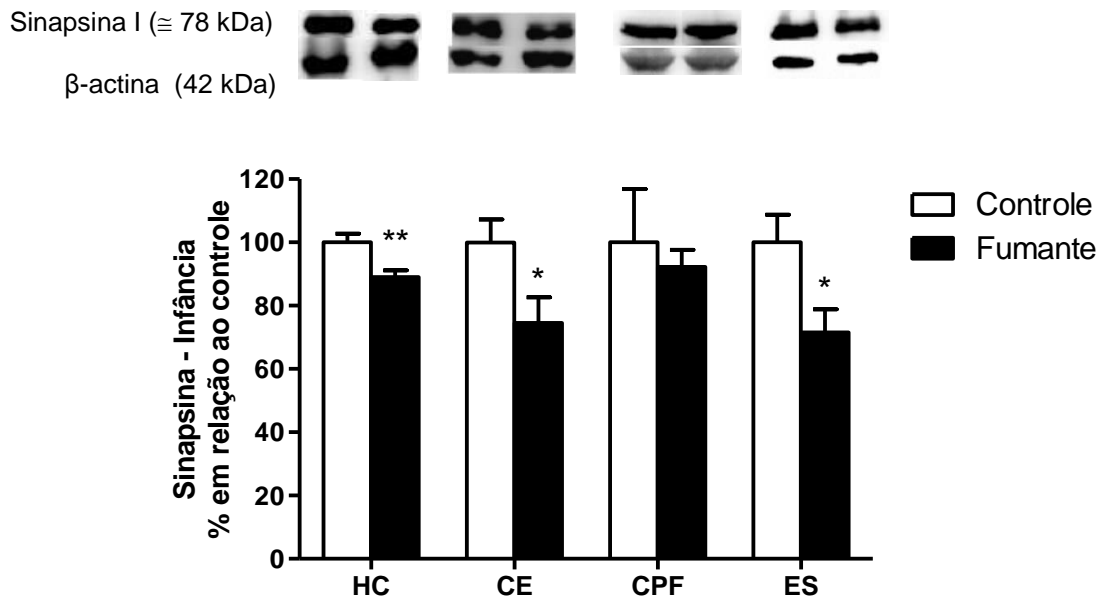


Figura 21: Quantificação de sinapsina I por *immunoblotting* no hipocampo (HC), cerebelo (CE), córtex pré-frontal (CPF) e estriado (ES) de animais de 15 dias expostos à fumaça do cigarro em comparação ao controle. Dados expressos em % em relação ao controle (média  $\pm$  EPM). Teste “t” de Student para amostras não pareadas. \* $p < 0,05$ .

A Figura 22 ilustra a imunorreatividade de sinaptofisina no hipocampo, cerebelo, córtex pré-frontal e estriado em animais de 15 dias, enquanto a Figura 23 mostra a quantificação de sinaptofisina por meio de imuno-histoquímica nas diferentes estruturas. Os resultados demonstram que houve diminuição estatisticamente significativa no hipocampo ( $p < 0,05$ ), no cerebelo ( $p < 0,05$ ) e no córtex pré-frontal ( $p < 0,05$ ) dos animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal em comparação ao controle.

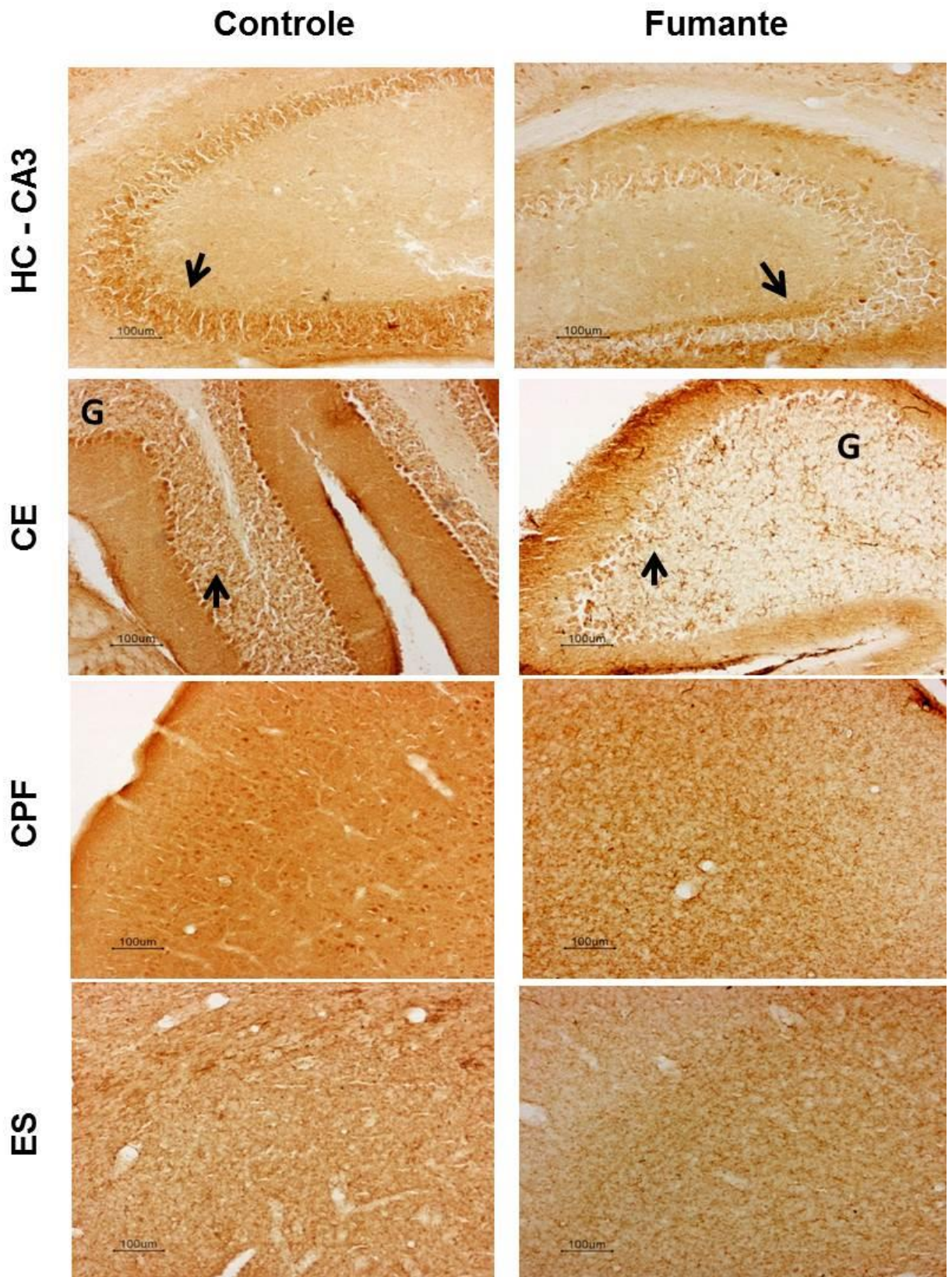


Figura 22: Micrografias ilustrando a imunorreatividade da sinaptofisina na região CA3 do hipocampo (HC), no cerebelo (CE), no córtex pré-frontal (CPF) e no estriado (ES) de animais de 15 dias controle e expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal. G: camada granular do cerebelo.

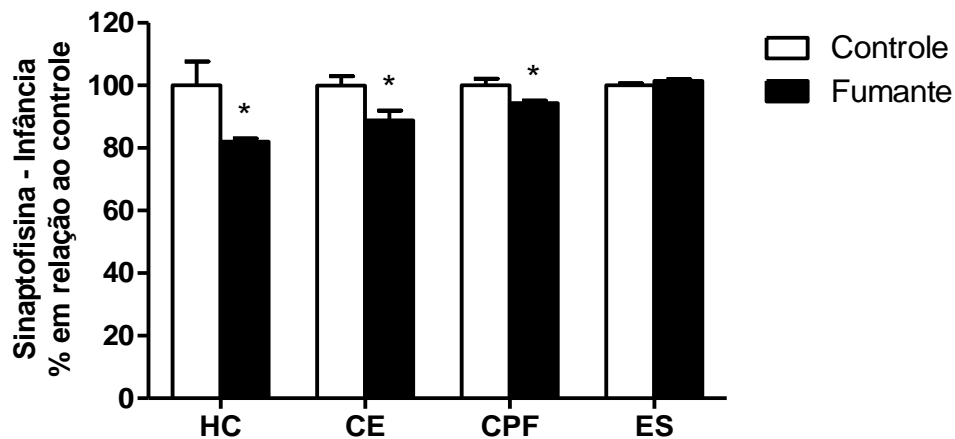


Figura 23: Quantificação de sinaptofisina no hipocampo (HC), cerebelo (CE), córtex pré-frontal (CPF) e estriado (ES) por imuno-histoquímica em animais de 15 dias expostos à fumaça do cigarro em comparação ao controle. Dados expressos em % em relação ao controle (média  $\pm$  EPM). Teste “t” de Student para amostras não pareadas. \* $p < 0,05$ .

A Figura 24 apresenta o resultado obtido na quantificação da sinaptofisina por *immunoblotting* em animais de 15 dias. É possível observar que a fumaça do cigarro induziu diminuição estatisticamente significativa da sinaptofisina no hipocampo ( $p < 0,05$ ), no córtex pré-frontal ( $p < 0,05$ ) e no estriado ( $p < 0,05$ ). Nenhuma diferença estatística foi observada no cerebelo.

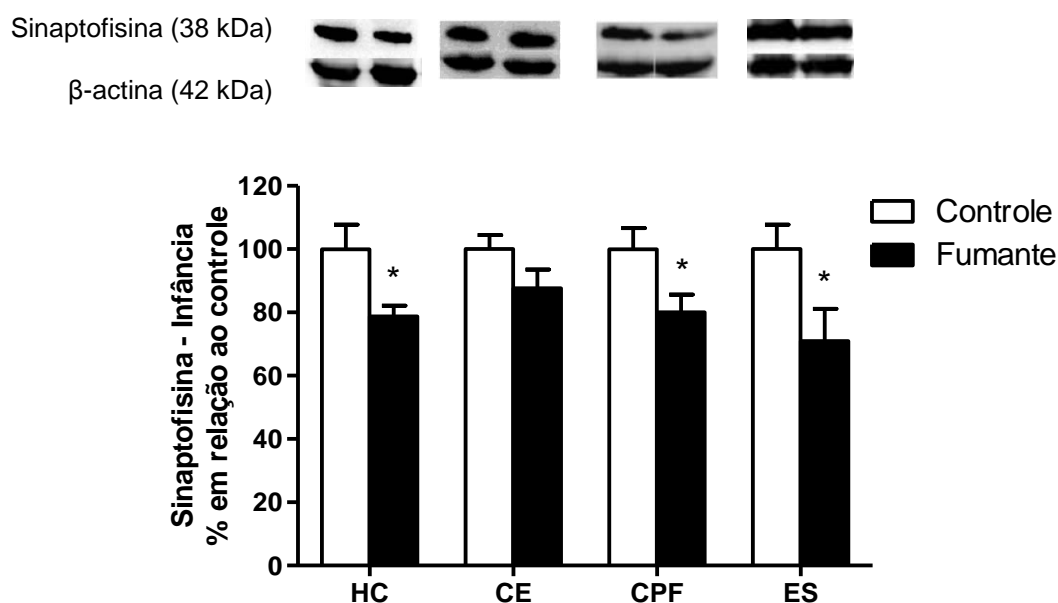


Figura 24: Quantificação de sinaptofisina por *immunoblotting* no hipocampo (HC), cerebelo (CE), córtex pré-frontal (CPF) e estriado (ES) de animais de 15 dias expostos à fumaça do cigarro em comparação ao controle. Dados expressos em % em relação ao controle (média ± EPM). Teste “t” de Student para amostras não pareadas. \* $p < 0,05$ .

#### 4.2.5.2. ADOLESCÊNCIA

A Figura 25 ilustra a imunorreatividade de sinapsina I no hipocampo, cerebelo, córtex pré-frontal e estriado na adolescência. Na Figura 26 é possível observar a quantificação de sinapsina I por meio de imuno-histoquímica nas diferentes estruturas. Houve diminuição estatisticamente significativa para sinapsina I no hipocampo ( $p < 0,001$ ), no cerebelo ( $p < 0,05$ ) e no estriado ( $p < 0,05$ ) de animais de 35 dias expostos à fumaça do cigarro em comparação ao controle.

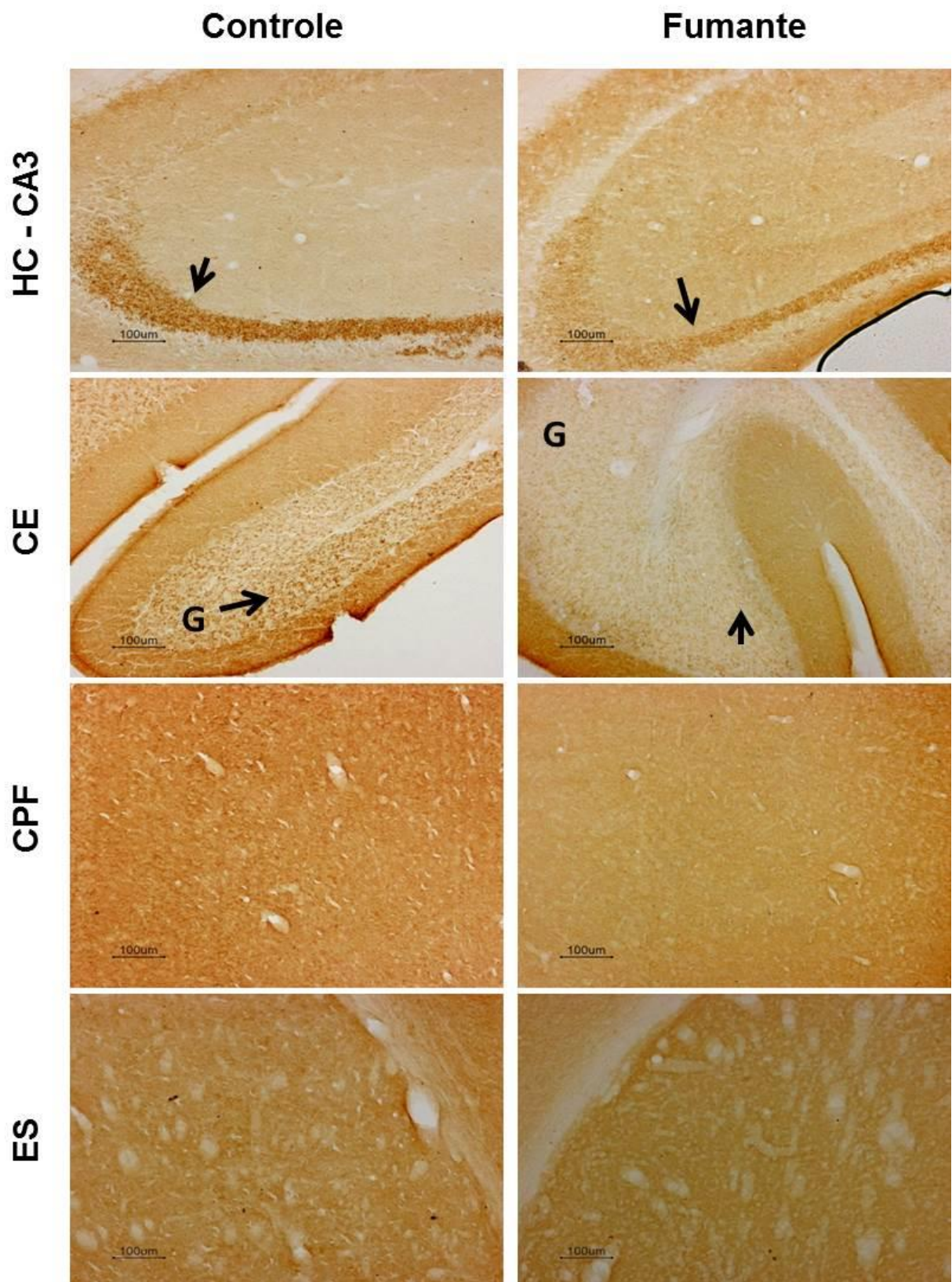


Figura 25: Micrografias ilustrando a imunorreatividade da sinapsina I na região CA3 do hipocampo (HC), no cerebelo (CE), no córtex pré-frontal (CPF) e no estriado (ES) de animais de 35 dias controle e expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal. G: camada granular do cerebelo.

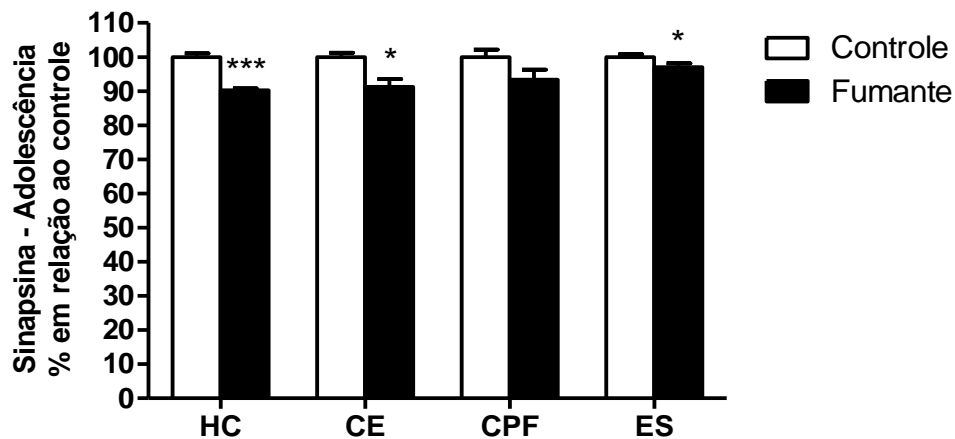


Figura 26: Quantificação de sinapsina I no hipocampo (HC), cerebelo (CE), córtex pré-frontal (CPF) e estriado (ES) por imuno-histoquímica em animais de 35 dias expostos à fumaça do cigarro em comparação ao controle. Dados expressos em % em relação ao controle (média  $\pm$  EPM). Teste “t” de Student para amostras não pareadas. \* $p < 0,05$ .

Os animais de 35 dias expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal apresentaram diminuição estatisticamente significativa da sinapsina I (*immunoblotting*) no hipocampo ( $p < 0,05$ ), cerebelo ( $p < 0,05$ ) e no estriado ( $p < 0,05$ ). Nenhuma diferença estatística foi observada no córtex pré-frontal, como pode ser visto na Figura 27.

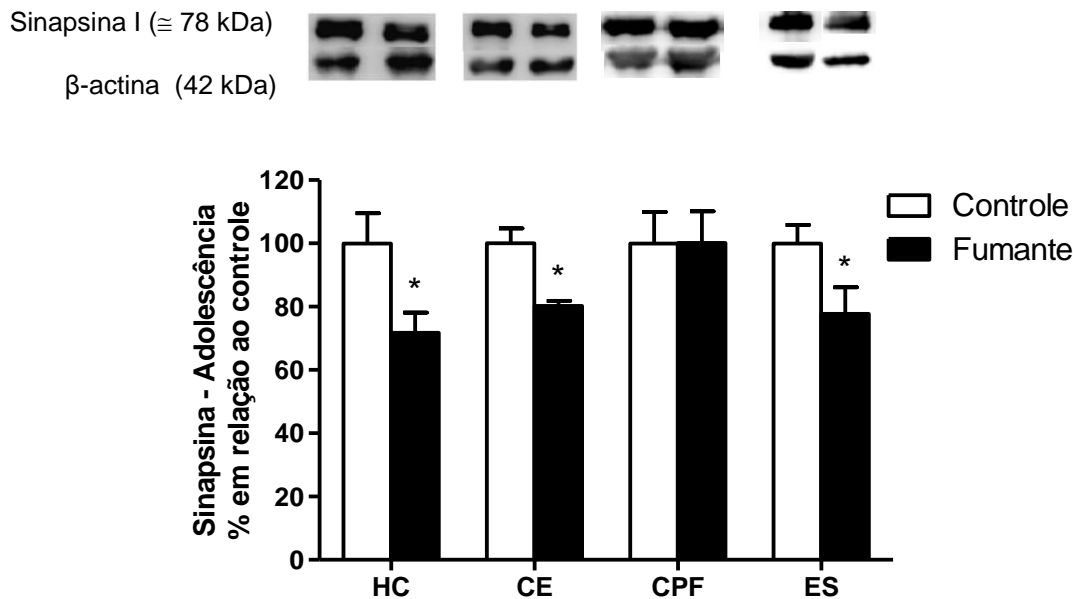


Figura 27: Quantificação de sinapsina I por *immunoblotting* no hipocampo (HC), cerebelo (CE), córtex pré-frontal (CPF) e estriado (ES) de animais de 35 dias expostos à fumaça do cigarro em comparação ao controle. Dados expressos em % em relação ao controle (média ± EPM). Teste “t” de Student para amostras não pareadas. \* $p < 0,05$ .

A Figura 28 ilustra a imunorreatividade de sinaptofisina no hipocampo, cerebelo, córtex pré-frontal e estriado em animais de 35 dias, enquanto a Figura 29 apresenta a quantificação de sinaptofisina por meio de imuno-histoquímica nas diferentes estruturas. Pode-se observar diminuição estatisticamente significativa da sinaptofisina no hipocampo ( $p < 0,05$ ), cerebelo ( $p < 0,01$ ) e córtex pré-frontal ( $p < 0,05$ ) dos animais expostos à fumaça do cigarro em relação ao controle.

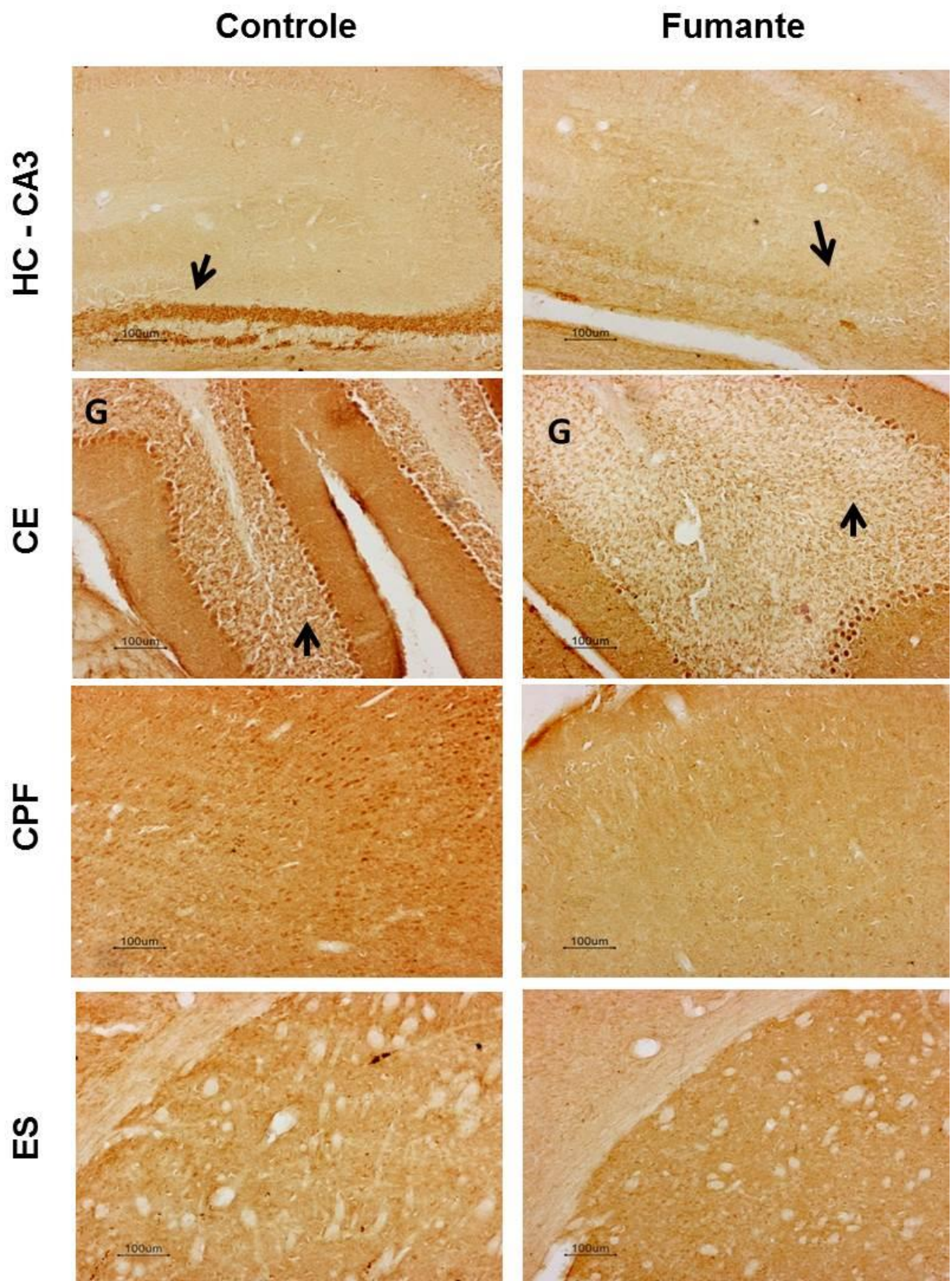


Figura 28: Micrografias ilustrando a imunorreatividade da sinaptofisina na região CA3 do hipocampo (HC), no cerebelo (CE), no córtex pré-frontal (CPF) e no estriado (ES) de animais de 35 dias controle e expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal. G: camada granular do cerebelo.



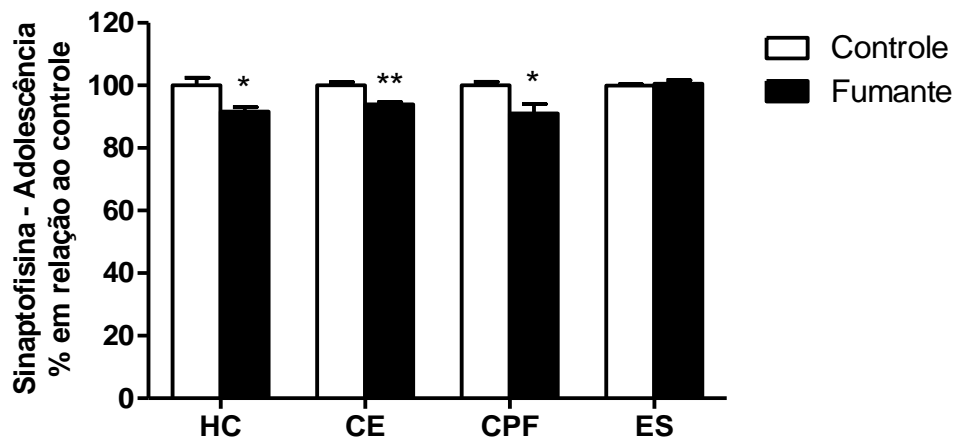


Figura 29: Quantificação de sinaptofisina no hipocampo (HC), cerebelo (CE), córtex pré-frontal (CPF) e estriado (ES) por imuno-histoquímica em animais de 35 dias expostos à fumaça do cigarro em comparação ao controle. Dados expressos em % em relação ao controle (média  $\pm$  EPM). Teste “t” de Student para amostras não pareadas. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ .

A Figura 30 mostra o resultado obtido na quantificação da sinaptofisina por *immunoblotting* em animais de 35 dias. Houve diminuição estatisticamente significativa da sinaptofisina no hipocampo ( $p<0,01$ ), cerebelo ( $p<0,05$ ) e no córtex pré-frontal ( $p<0,001$ ). Nenhuma diferença estatística foi observada no estriado.

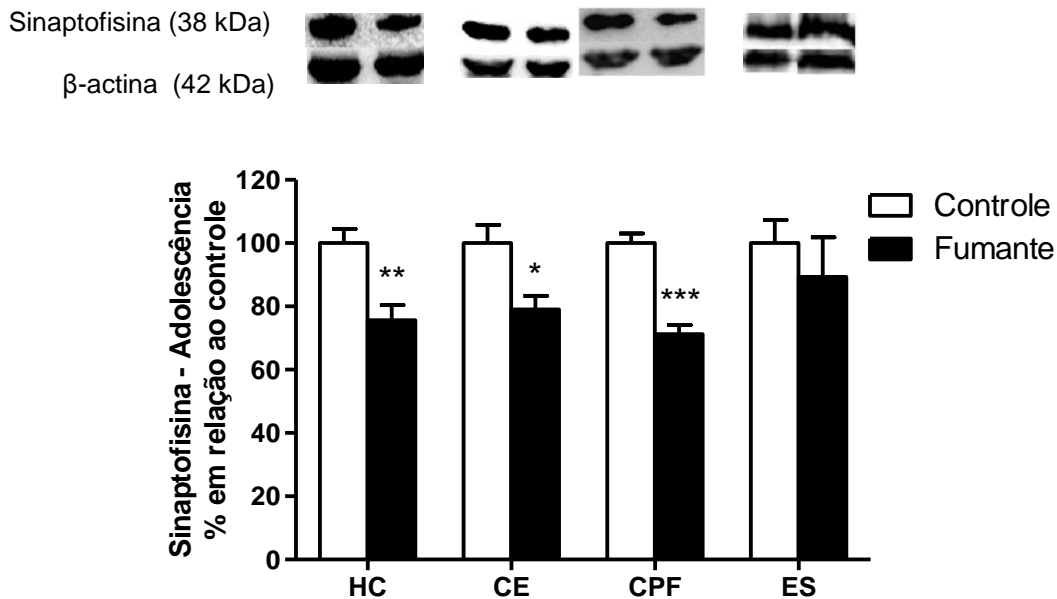


Figura 30: Quantifica33o de sinaptofisina por *immunoblotting* no hipocampo (HC), cerebelo (CE), c3rtex pr3-frontal (CPF) e estriado (ES) de animais de 35 dias expostos 3 fuma3a do cigarro em compara33o ao controle. Dados expressos em % em rela33o ao controle (m3dia  $\pm$  EPM). Teste "t" de Student para amostras n3o pareadas. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.2.5.3. ADULTO

A Figura 31 ilustra a imunorreatividade de sinapsina I no hipocampo, cerebelo, c3rtex pr3-frontal e estriado na fase adulta, enquanto a Figura 32 apresenta a quantifica33o de sinapsina I por meio de imuno-histoqu3mica nas diferentes estruturas. Nenhuma diferen3a estat3stica foi observada entre animais expostos 3 fuma3a do cigarro em rela33o ao controle.

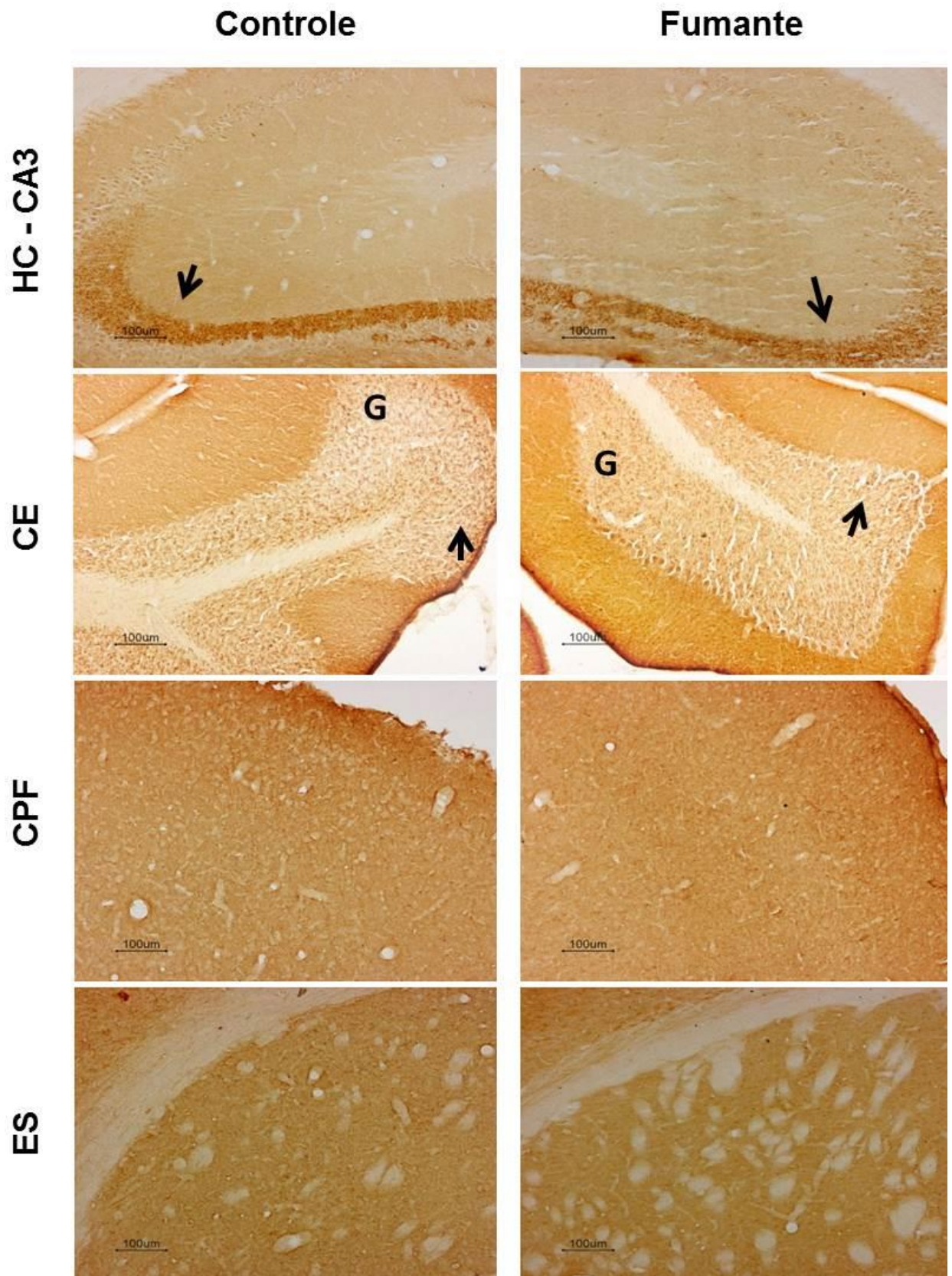


Figura 31: Micrografias ilustrando a imunorreatividade da sinapsina I na região CA3 do hipocampo (HC), no cerebelo (CE), no córtex pré-frontal (CPF) e no estriado (ES) de animais de 65 dias controle e expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal. G: camada granular do cerebelo.

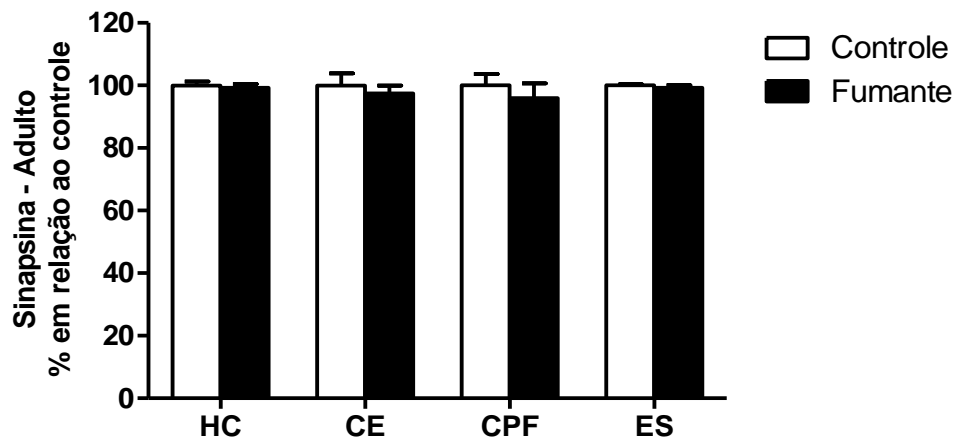


Figura 32: Quantificação de sinapsina I no hipocampo (HC), cerebelo (CE), córtex pré-frontal (CPF) e estriado (ES) por imuno-histoquímica em animais de 65 dias expostos à fumaça do cigarro em comparação ao controle. Dados expressos em % em relação ao controle (média  $\pm$  EPM). Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

Conforme pode ser visto na Figura 33, a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal induziu diminuição estatisticamente significativa da sinapsina I (*immunoblotting*) no hipocampo ( $p < 0,05$ ) e no cerebelo ( $p < 0,05$ ) dos animais de 65 dias. Nenhuma outra diferença estatística foi observada.

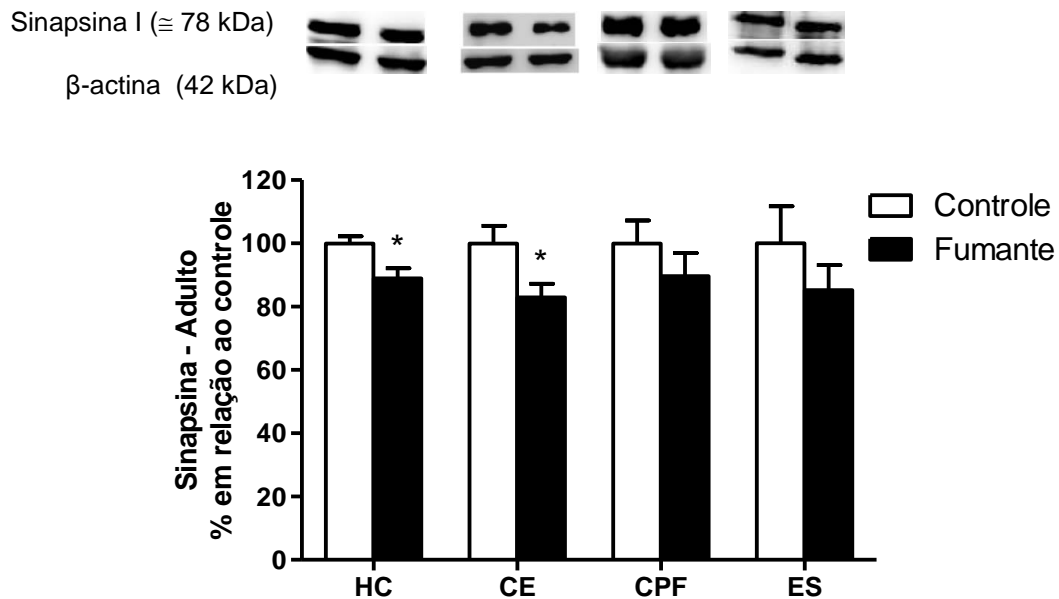


Figura 33: Quantificação de sinapsina I por *immunoblotting* no hipocampo (HC), cerebelo (CE), córtex pré-frontal (CPF) e estriado (ES) de animais de 65 dias expostos à fumaça do cigarro em comparação ao controle. Dados expressos em % em relação ao controle (média ± EPM). Teste “t” de Student para amostras não pareadas. \* $p < 0,05$ .

Na Figura 34 é possível observar a imunorreatividade de sinaptofisina no hipocampo, cerebelo, córtex pré-frontal e estriado em animais de 65 dias, enquanto na Figura 35 é possível observar a quantificação de sinaptofisina por meio de imunohistoquímica nas diferentes estruturas. Nenhuma diferença estatística foi observada entre animais expostos à fumaça do cigarro em relação ao controle.

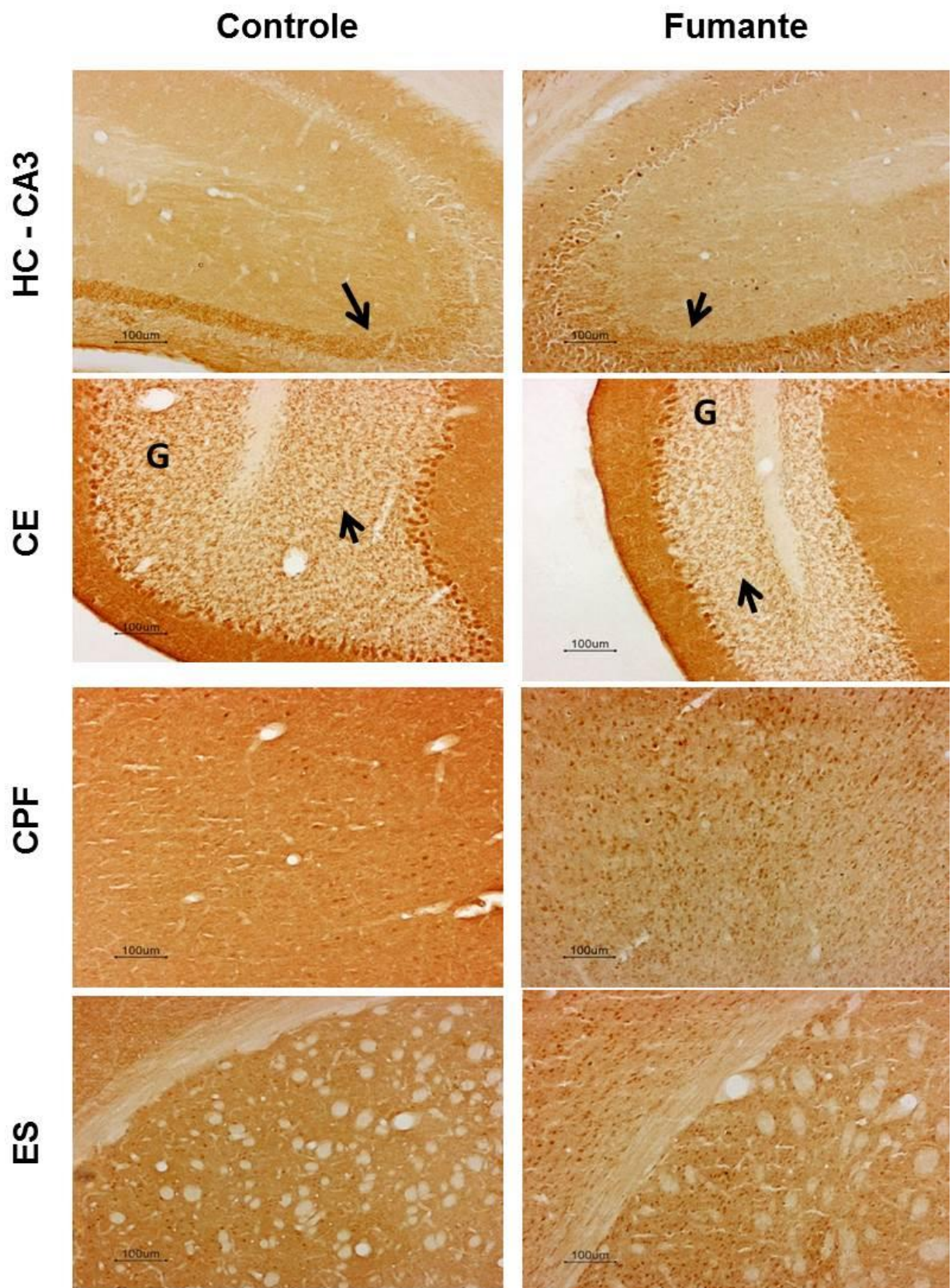


Figura 34: Micrografias ilustrando a imunorreatividade da sinaptofisina na região CA3 do hipocampo (HC), no cerebelo (CE), no córtex pré-frontal (CPF) e no estriado (ES) de animais de 65 dias controle e expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal. G: camada granular do cerebelo.

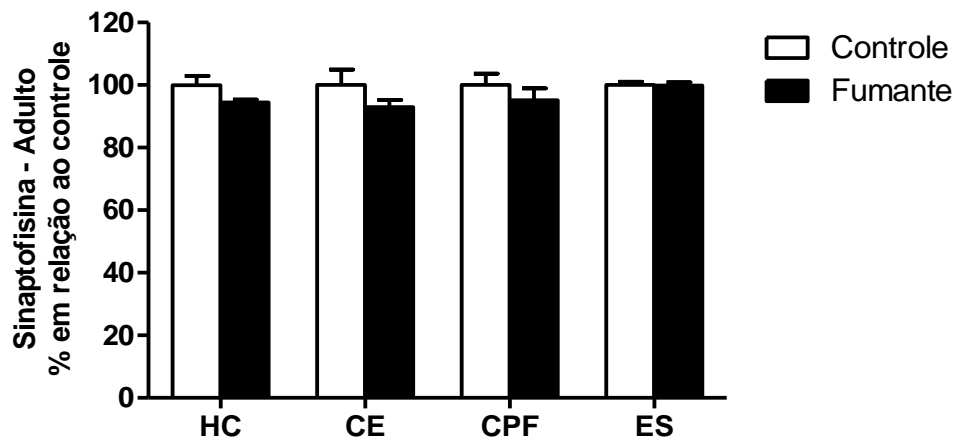


Figura 35: Quantificação de sinaptofisina no hipocampo (HC), cerebelo (CE), córtex pré-frontal (CPF) e estriado (ES) por imuno-histoquímica em animais de 65 dias expostos à fumaça do cigarro em comparação ao controle. Dados expressos em % em relação ao controle (média  $\pm$  EPM). Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

Conforme apresentado na Figura 36, a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal induziu diminuição estatisticamente significativa da sinaptofisina (*immunoblotting*) no hipocampo ( $p < 0,01$ ) e córtex pré-frontal ( $p < 0,01$ ) dos animais de 65 dias. Nenhuma outra diferença estatística foi observada.

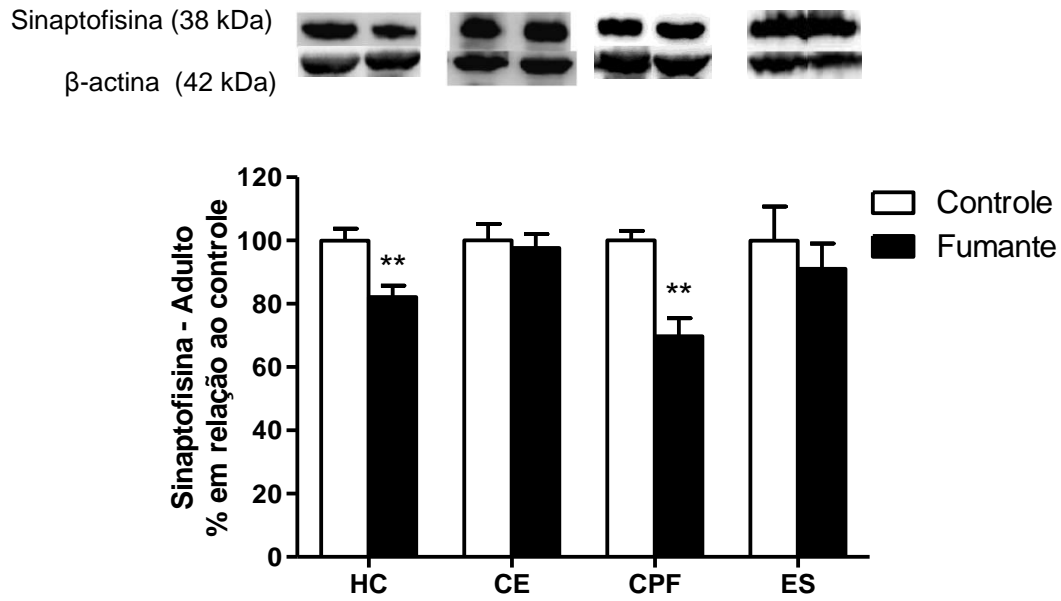


Figura 36:Quantificação de sinaptofisina por *immunoblotting* no hipocampo (HC), cerebelo (CE), córtex pré-frontal (CPF) e estriado (ES) de animais de 65 dias expostos à fumaça do cigarro em comparação ao controle. Dados expressos em % em relação ao controle (média ± EPM). Teste “t” de Student para amostras não pareadas. \*\* $p < 0,01$ .



### **4.3. MIELINIZAÇÃO**

#### **4.3.1. FIBRAS MIELINIZADAS E ÁREA DO NERVO ÓPTICO**

A Figura 37 ilustra micrografias eletrônicas do nervo óptico de animais dos grupos controles e expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal na infância, adolescência e fase adulta.

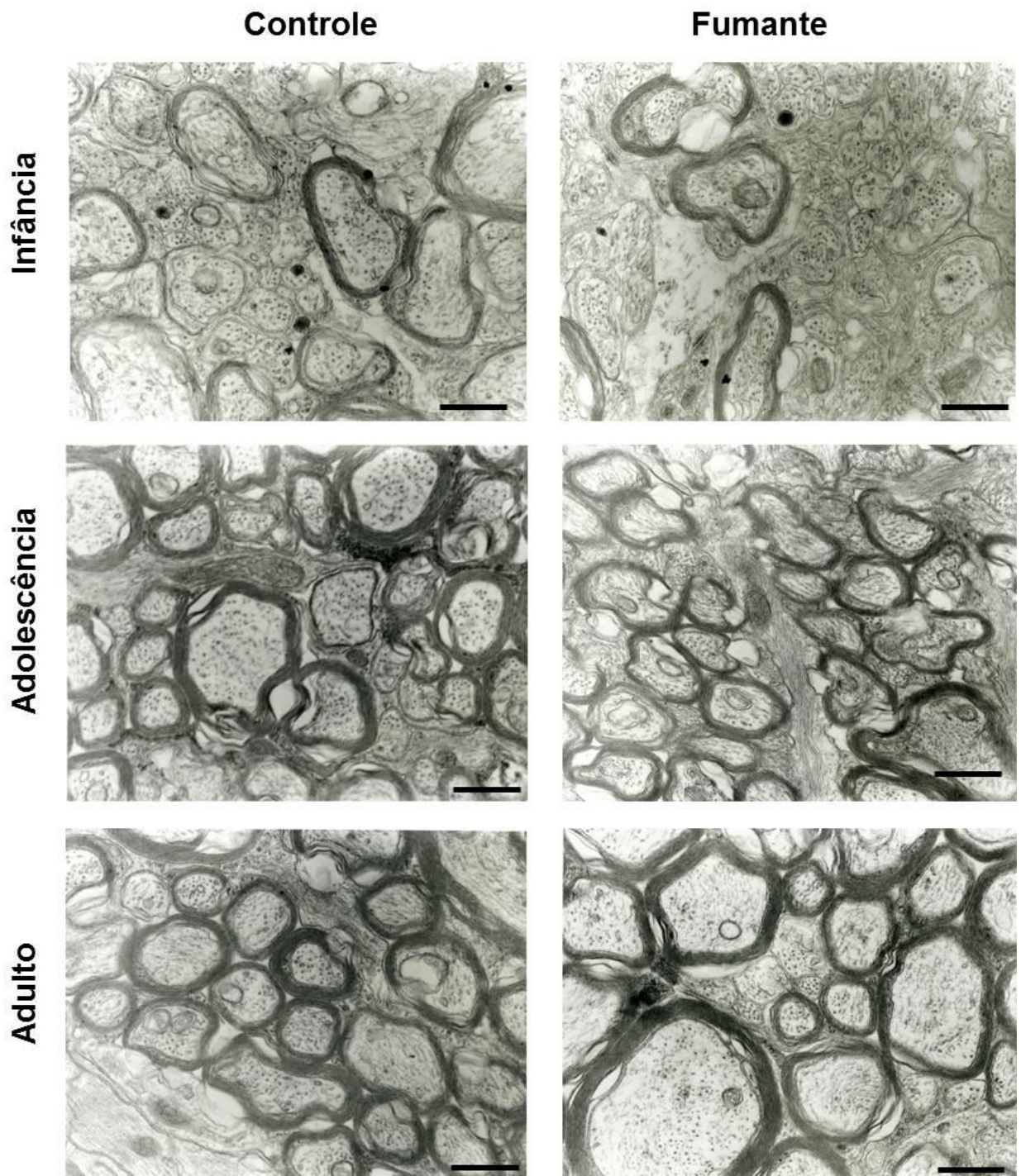


Figura 37: Fibras mielinizadas e não mielinizadas do nervo óptico de animais de 15, 35 e 65 dias dos grupos controle e expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal. Secções ultra-finas (70 nm de espessura) visualizadas em microscopia eletrônica de transmissão (JEOL-1010). Barra de escala: 150 nm.

Na quantificação da porcentagem de fibras mielinizadas foi possível observar diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nos animais expostos à fumaça do cigarro em relação ao controle na infância (Figura 38). Como esperado, houve aumento estatisticamente significativo da porcentagem de fibras mielinizadas nos animais adolescentes e adultos, tanto controle quanto fumante, em relação à infância, bem como nos adultos em relação à adolescência ( $p < 0,001$ ).

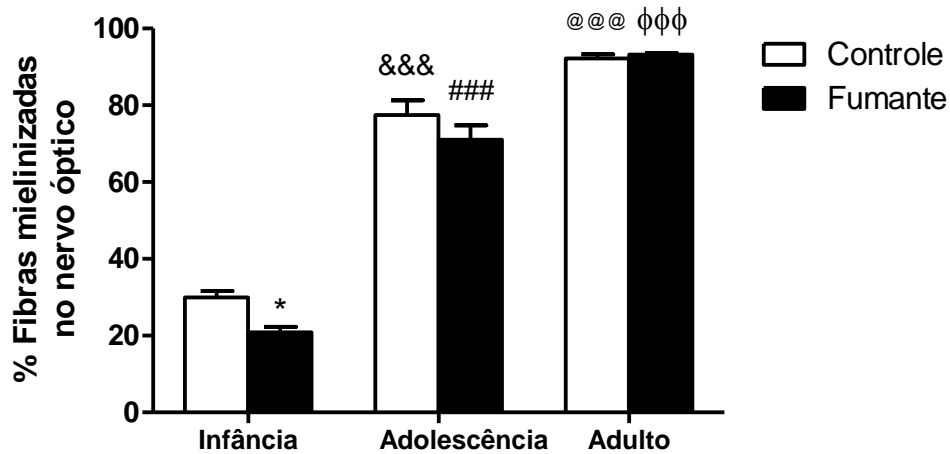


Figura 38: Porcentagem de fibras mielinizadas na infância (P15), adolescência (P35) e na fase adulta (P65) dos grupos controles e expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal. Dados expressos em porcentagem (média  $\pm$  EPM). ANOVA, seguido do teste *post-hoc* Student-Newman-Keuls. \* $p < 0,05$  em relação ao controle da mesma idade; (&&&)  $p < 0,001$  controle adolescência vs controle na infância; (###)  $p < 0,001$  fumante adolescência vs fumante na infância; (@@@)  $p < 0,001$  controle adulto vs controle na infância e adolescência; (ΦΦΦ)  $p < 0,001$  fumante adulto vs fumante na infância e adolescência.

A Figura 39 ilustra secções semi-finas do nervo óptico na infância, adolescência e fase adulta de animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal e de controles.

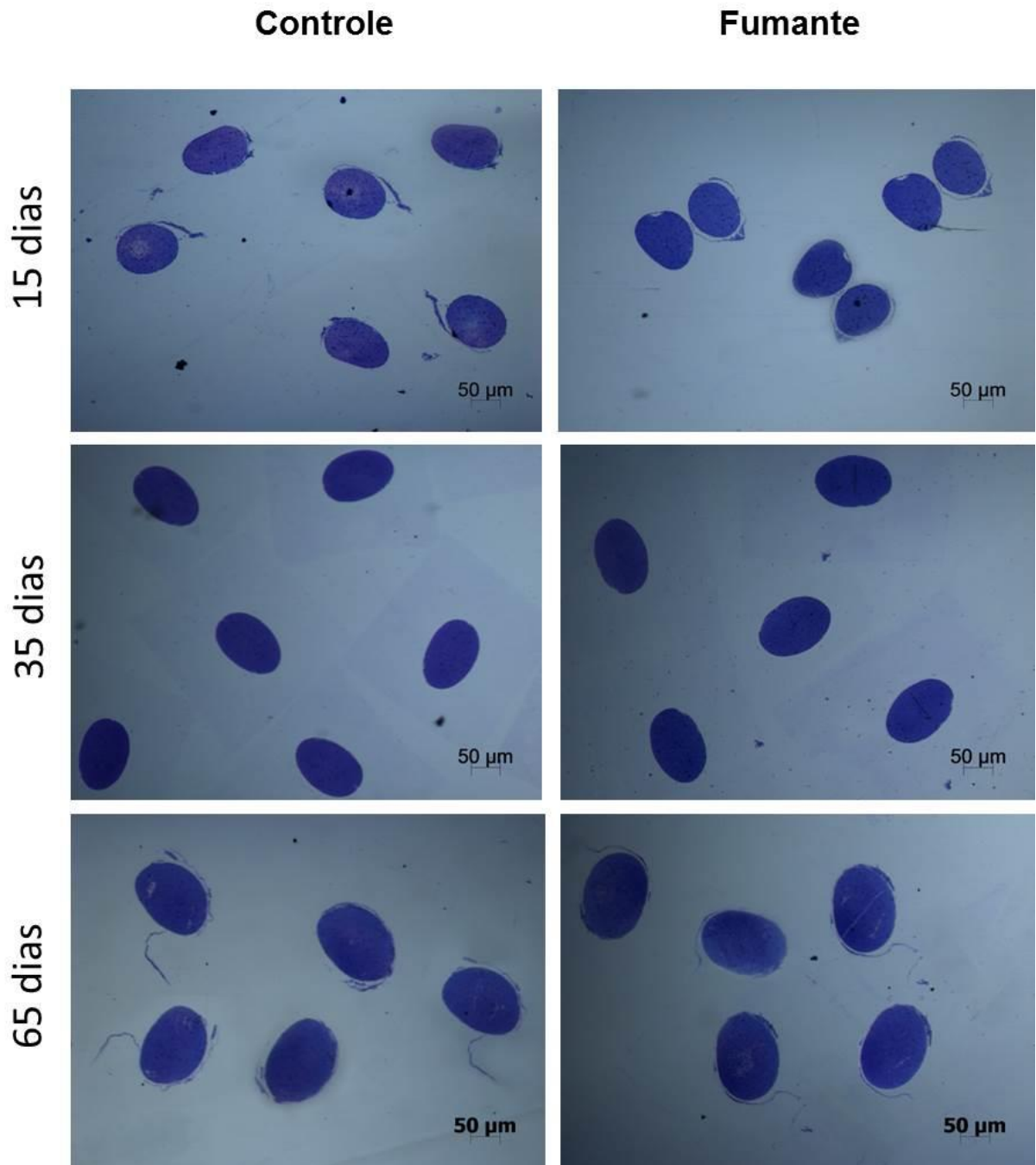


Figura 39: Micrografias ilustrando a área do nervo óptico de animais de diversas idades expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal e seus controles. Secções semi-finas de 400 nm de espessura corados com azul de toluidina a 2%. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

A análise da área do nervo óptico demonstrou que não houve diferença entre animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal em relação aos grupos controles, contudo, houve aumento estatisticamente significativo entre os grupos controles de 35 e 65 dias em relação ao grupo controle de 15 dias ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ; respectivamente), além de aumento estatisticamente significativo no grupo controle de 65 dias em relação ao grupo controle de 35 dias ( $p < 0,01$ ), como demonstrado na Figura 40. Também houve aumento estatisticamente significativo entre o grupo fumante de 65 dias em relação aos grupos fumantes de 15 e 35 dias ( $p < 0,001$ ). Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos fumantes de 15 e 35 dias.

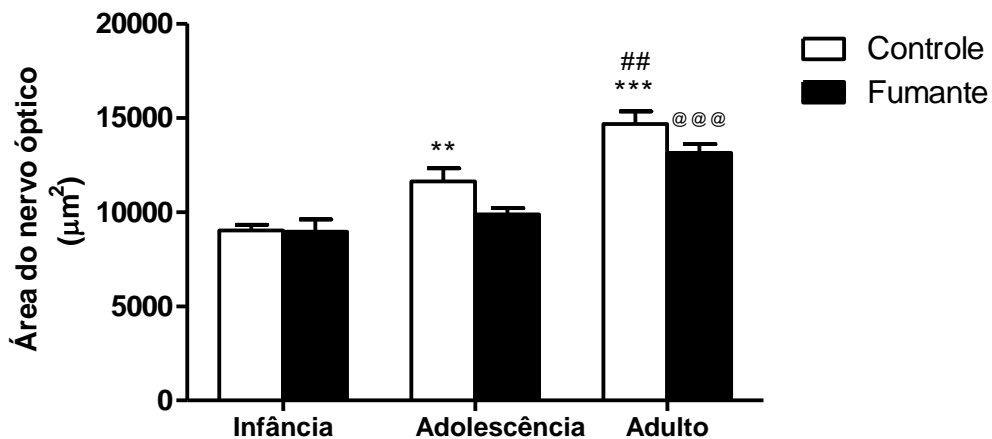


Figura 40: Área do nervo óptico de animais de diferentes idades expostos à fumaça do cigarro 3R4F no início do período pós-natal em comparação ao controle. Dados expressos em  $\mu\text{m}^2$  (média  $\pm$  EPM). ANOVA, seguido do teste *post-hoc* Student-Newman-Keuls. \*\* $p < 0,01$  controle de 35 dias vs controle de 15 dias; \*\*\* $p < 0,001$  controle de 65 dias vs controle de 15 dias; ## $p < 0,01$  controle de 65 dias vs controle de 35 dias; @@@  $p < 0,001$  fumante de 65 dias vs fumante de 15 e de 35 dias.

#### 4.3.2. PROTEÍNA BÁSICA DE MIELINA

A Figura 41 apresenta o resultado obtido na quantificação da PBM por *immunoblotting* no cerebelo, diencéfalo, telencéfalo e tronco encefálico de animais na infância (41A), adolescência (41B) e na fase adulta (41C). Pode-se observar que a fumaça do cigarro induziu aumento estatisticamente significativo da PBM apenas no cerebelo ( $p < 0,05$ ) na infância, enquanto na adolescência houve diminuição estatisticamente significativa da PBM no telencéfalo ( $p < 0,05$ ) e no tronco encefálico ( $p < 0,05$ ). Ainda, observamos que nos animais adultos expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal houve diminuição estatisticamente significativa da PBM ( $p < 0,05$ ) no cerebelo.

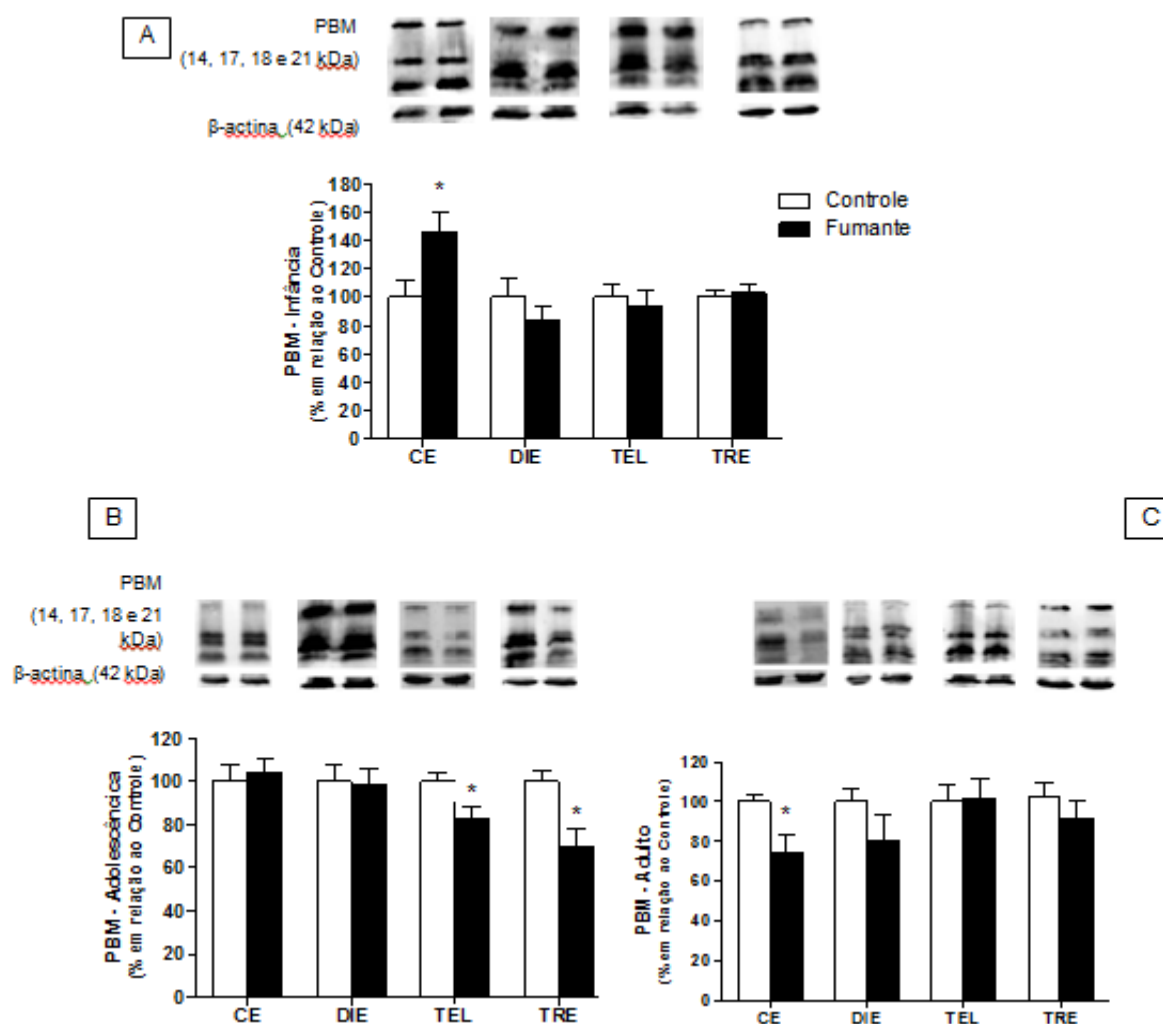


Figura 41: Quantificação de PBM por imunoblotting no cerebelo (CE), diencéfalo (DIE), telencéfalo (TEL) e tronco encefálico (TRE) de animais na infância (A), adolescência (B) e na fase adulta (C). Animais expostos à fumaça do cigarro em comparação ao controle. Dados expressos em % em relação ao controle (média  $\pm$  EPM). Teste "t" de Student para amostras não pareadas. \* $p < 0,05$ .

**DISCUSSÃO**



## 5. DISCUSSÃO

O fumo passivo é um problema de saúde pública e causa elevada morbidade respiratória e mortalidade em crianças de baixa idade, contudo, poucos trabalhos têm como foco seus efeitos no SNC (CARVALHO; PEREIRA, 2002; OBERG et al., 2011). Neste estudo observamos que a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal de camundongos induz alterações em processos críticos do desenvolvimento, como mielinização e sinaptogênese, com consequências no aprendizado e na memória. Tais resultados representam uma ferramenta que pode direcionar futuras pesquisas e políticas públicas que visem à prevenção dos danos causados pelo fumo passivo.

No presente estudo realizamos exposição a uma mistura de fumaça central e lateral do cigarro para mimetizar o fumo passivo. A monitorização ambiental da exposição demonstrou resultados semelhantes ao observado em trabalho anterior de nosso grupo (TORRES et al., 2012) e também por Biselli et al. (2011). Em estudo anterior avaliamos os efeitos da fumaça do cigarro no estresse oxidativo no SNC de camundongos jovens por meio da exposição diária (2 horas/dia) durante 14 dias e observamos concentração de CO de  $500,9 \pm 158,6$  ppm (TORRES et al., 2012). Vale destacar que esse resultado se refere à fumaça de cigarros comerciais (Souza Cruz - Derby Vermelho), os mesmos utilizados por Biselli et al. (2011), que avaliaram camundongos expostos à fumaça central do cigarro 2 horas/dia, 5 dias/semana durante dois meses e a concentração de CO variou entre 250 e 350 ppm (BISELLI et al., 2011).

A monitorização biológica da exposição foi realizada pelas análises de COHb, nicotina e cotinina. O sangue foi colhido imediatamente após a última exposição, já que a COHb possui meia-vida de 30 minutos em camundongos devido a ligação

lável entre o monóxido de carbono e a hemoglobina desses roedores (MELLO et al., 2005). Utilizamos cerca de 10 cigarros/hora por dia, enquanto BISELLI et al. (2011) utilizou 45 cigarros, o que pode justificar o valor de 23% de COHb encontrada nos animais deste grupo, em comparação com 12% encontrados em nosso estudo. Vale destacar que este valor é próximo ao encontrado em humanos fumantes que varia de 3 a 9%. A COHb em fumantes depende de vários fatores como a tragada e o número de cigarros fumados e permanece praticamente constante ao longo do dia, já que sua meia-vida em humanos é de 3 horas e os fumantes têm o hábito de fumar periodicamente (MELLO et al., 2005). Obot et al. (2004) realizaram a exposição de camundongos à fumaça do cigarro 2R4F da Universidade de Kentucky durante 7 dias. Os valores de COHb permaneceram em torno de 26%, para uma concentração de CO de 280 ppm e como estes autores utilizaram uma máquina de fumar (*Condor smoking machines, KC Automation, Richmond, VA*) a variação de CO foi de apenas  $\pm 3$  ppm (OBOT et al., 2004).

Nossos resultados indicam que os valores de nicotina (126,1 ng/mL) e cotinina (100,8 ng/mL) plasmática são condizentes com os observados em estudo anterior de nosso grupo (183,3 ng/mL e 145,6 ng/mL, respectivamente) (TORRES et al., 2012) e com outros trabalhos que avaliam os efeitos da fumaça do cigarro em roedores. Amos-Kroohs et al. (2013) avaliaram os efeitos da exposição à fumaça do cigarro durante o período gestacional e início do período pós-natal no processo de aprendizagem e memória de camundongos adultos e observaram níveis plasmáticos de cotinina de 82,74 ng/mL (AMOS-KROOHS et al., 2013), enquanto Obot et al. (2004) relataram concentrações de nicotina e cotinina plasmática em torno de 80 e 190 ng/g de plasma, respectivamente (correspondente à 82 e 103,32 ng/mL, já que a densidade plasmática = 1,025 g/mL) (OBOT et al., 2004).

No estudo conduzido por Obot et al. (2004) também foi possível observar diminuição no peso de animais expostos à fumaça do cigarro ( $25,8 \pm 1,0$  g vs  $25,1 \pm 0,7$  g;  $p < 0,05$ ). De fato, diversos estudos demonstram relação inversa entre o uso de produtos derivados do tabaco e o peso corporal em humanos e roedores (CHEN et al., 2005; FRANKISH et al., 1995; LI et al., 2000). É consenso que os filhos de mães que fumam durante a gravidez têm cerca de 200g a menos do que as que não fumam. A redução do peso ao nascer pode trazer sérias consequências, uma vez que está relacionada a altos índices de morbidade e mortalidade infantil (SWAN; LESSOV-SCHLAGGAR, 2007).

Nossos resultados são coerentes e indicam que a exposição à fumaça do cigarro induz diminuição de peso em camundongos na infância e na adolescência. Contudo, não houve diferença na fase adulta, o que sugere uma recuperação destes animais.

Abreu-Villaça et al. (2010) avaliaram os efeitos de diferentes concentrações de nicotina na fumaça do cigarro em camundongos C57BL/6 e Swiss expostos por 15 dias. Os autores utilizaram cigarros 4A1 (0,14 mg de nicotina/cigarro) e 3R4F (0,73 mg de nicotina/cigarro) da Universidade de Kentucky e observaram que nos C57BL/6 os cigarros 4A1 não induziram alteração no ganho de peso, enquanto que os cigarros 3R4F levaram à uma diminuição do ganho de peso em relação ao controle (3,4 vs 1,8 g). Na linhagem Swiss houve diminuição do ganho de peso em relação ao controle (9,1 vs 4,5 g) induzida pelos cigarros 4A1 e uma perda de peso em relação ao início da exposição induzida pelo cigarro 3R4F (-1,6 g). Esses resultados sugerem que a nicotina é o principal constituinte do tabaco responsável pelos efeitos no peso corporal (ABREU-VILLAÇA et al., 2010).

A administração de nicotina em roedores reduz o consumo de alimento, aumenta o gasto energético e diminui o peso de animais (FRANKISH et al., 1995). Os mecanismos pelos quais a nicotina exerce este efeito ainda não estão bem esclarecidos, mas provavelmente são mediados pelo hipotálamo, estrutura envolvida na regulação da alimentação, no balanço energético e no peso corporal. Assim, como são encontrados receptores nicotínicos em áreas do hipotálamo que regulam o apetite (JO; TALMAGE; ROLE, 2002), a fumaça do cigarro pode afetar o apetite de roedores por alterar os circuitos da homeostasia energética, incluindo tanto a liberação de peptídeos orexigênicos quanto de peptídeos anorexigênicos (CHEN et al., 2005).

O neuropeptídeo Y (NYP), abundante no encéfalo de mamíferos e com altas concentrações no hipotálamo, é conhecido por seu papel no aumento do consumo de alimentos. FRANKISH et al. (1995) demonstraram que tanto o efeito agudo (24 h) quanto a longo prazo (2 semanas) de altas doses de nicotina (12 mg/kg/dia) diminuem o conteúdo e a expressão de RNAm do NPY no hipotálamo (núcleos arqueado e paraventricular) de ratos, além de redução de 30% do consumo de alimentos (FRANKISH et al., 1995).

GAWORSKI et al. (2004) avaliaram o efeito da fumaça central do cigarro na prole (geração F1) de ratos expostos duas horas/dia, sete dias/semana a partir de duas semanas antes do acasalamento até 21 dias após o nascimento dos filhotes. Os autores relataram que a exposição à fumaça do cigarro durante a gestação e o aleitamento reduz o peso do animal ao nascer e retarda o crescimento do rato neonato. No entanto, nenhuma alteração em marcos de desenvolvimento, como idade de patência vaginal ou separação prepucial (P21) ou mesmo na resposta

acústica (P22 e P61), aprendizado e memória (P21 e P61), atividade locomotora (P17 e P61) foram observadas na geração F1 (GAWORSKI et al., 2004).

Ao contrário de GAWORSKI et al. (2004), que não observaram alteração na atividade locomotora ou no aprendizado e memória, nossos resultados sugerem que a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal causa diminuição na atividade locomotora e efeito ansiogênico, além de induzir prejuízo no aprendizado e memória e na transmissão sináptica em um período crítico do desenvolvimento do SNC.

O presente trabalho demonstra que animais expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal apresentam prejuízo durante o treino para avaliar a memória de referência espacial na infância, sugerindo uma deficiência de aprendizado em um período crítico do desenvolvimento. Vale ressaltar que a diminuição na atividade locomotora observada em campo aberto não influencia os resultados obtidos no labirinto aquático de Morris, já que são comportamentos distintos e não houve diferença estatística na distância total percorrida no labirinto aquático de Morris pelos animais controles e expostos à fumaça do cigarro.

Durante o teste, foi possível observar que a exposição à fumaça do cigarro induz diminuição do tempo de permanência e da distância percorrida no quadrante alvo e no contador independente da idade. É importante observar que a análise de tais parâmetros no contador é mais específica do que no quadrante alvo, já que o contador representa uma área menor do labirinto aquático (XAVIER; OLIVEIRA-FILHO; SANTOS, 1999). O número de vezes em que os animais atravessaram o local onde a plataforma estava confirmam esses resultados. Portanto, a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal parece induzir uma deficiência no

aprendizado na infância e um prejuízo na aquisição de memória, sendo que neste caso não há recuperação na adolescência ou na fase adulta.

Estes dados são condizentes com pesquisa que demonstrou que crianças e adolescentes expostos ao fumo passivo apresentam deficiência de aprendizado, evidenciado por um pior desempenho escolar (YOLTON et al., 2004). Contudo, não estão totalmente de acordo com trabalho realizado por Amos-Kroohs et al. (2013), que avaliaram a exposição à fumaça de cigarro no período gestacional e início do período pós-natal de ratos. Os resultados obtidos por Amos-Kroohs et al. (2013) na análise da memória de referência espacial foram controversos, já que animais expostos à fumaça do cigarro apresentaram melhor desempenho em um experimento e pior em outro. Ainda, os autores não observaram nenhuma diferença na memória operacional espacial (AMOS-KROOHS et al., 2013).

O teste da memória operacional espacial visa a análise da memória de curto prazo, uma vez que representa o que foi aprendido no dia e o animal não pode utilizar esse aprendizado nos dias posteriores. A tarefa foi realizada com diferentes intervalos de tempo entre as tentativas (ITI), sendo que na segunda fase o ITI foi virtualmente zero para avaliar se em menor intervalo de tempo os animais teriam melhor desempenho (SANTOS, 1999). Nossos resultados indicam que à fumaça do cigarro no início do período pós-natal induz prejuízo na memória operacional espacial na infância e na adolescência quando o ITI foi de 10 minutos enquanto nenhuma diferença foi observada com ITI virtualmente zero, ou seja, houve aquisição da informação, mas não houve retenção da informação pelos animais expostos à fumaça do cigarro na infância e na adolescência. Ainda, o resultado obtido com ITI virtualmente zero indica que os animais expostos à fumaça do cigarro

no início do período pós-natal não apresentam nenhum comprometimento motor ou visual.

Este dado é coerente com alterações fisiológicas que ocorrem nessa idade, já que o aprendizado e a memória são processos consolidados no final da infância e na adolescência (MATTHEWS et al., 1974; SLOTKIN, 2004; ZAHALKA et al., 1993). Ainda, é importante destacar que tais processos envolvem a maturação do sistema colinérgico e portanto, são susceptíveis à exposição pela fumaça do cigarro.

A memória operacional em humanos envolve o armazenamento temporário e o processamento simultâneo de informações que são críticas para as tarefas cognitivas complexas, como o aprendizado, a compreensão da linguagem e o raciocínio (BADDELEY, 1992). Crianças que são expostas ao fumo passivo desde a idade pré-escolar até a adolescência apresentam pior desempenho em tarefas que avaliam a memória operacional (BENNETT et al., 2013; FRIED; WATKINSON, 2001). Cho et al. (2013) avaliaram correlação entre os níveis de cotinina urinária e a deficiência de aprendizagem, além do TDAH em crianças de cerca de 9 anos. Os autores observaram que as crianças expostas ao fumo passivo podem apresentar TDAH e dificuldades de aprendizagem, provavelmente mediada por déficit de atenção (CHO et al., 2013).

Embora o hipocampo seja a principal estrutura responsável pela aprendizagem espacial e pela memória, há indícios de que o cerebelo possa estar associado a alterações comportamentais, principalmente relacionadas ao TDAH. Em um estudo de meta-análise de trabalhos que avaliaram imagens estruturais do cérebro de indivíduos com TDAH foi observado anormalidades no volume do cerebelo, como redução em áreas do cerebelo posterior, tais como o lóbulo VIII (VALERA et al., 2007).

Diamond (2000) descreve que o desenvolvimento motor e cognitivo são interligados e exibem percurso temporal prolongados e semelhantes. Se há um transtorno neurológico que compromete o desenvolvimento cognitivo, o desenvolvimento motor muitas vezes é prejudicado. Ainda, a autora relata uma estreita relação entre o desenvolvimento do cerebelo e do córtex pré-frontal, que pode ser importante para funções cognitivas e motoras (DIAMOND, 2000).

Em nosso trabalho observamos diminuição na atividade locomotora na infância (P18) e adolescência (P35). Em conjunto com os dados bioquímicos, que demonstram diminuição dos níveis de proteínas sinápticas e de BDNF, nosso trabalho sugere que a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal causa prejuízo ao desenvolvimento de estruturas críticas para a atividade locomotora, como o cerebelo e o estriado.

Entretanto, nossos resultados não estão de acordo com trabalhos que avaliam os efeitos da fumaça do cigarro na atividade locomotora. Paulson *et al.* (1993) demonstram que ratos Sprague-Dawley que receberam extrato de tabaco por gavagem oral durante o período gestacional (1,33; 4,0 ou 6,0 mg/kg de nicotina) tiveram filhotes com aumento da atividade locomotora em P25. Suemaru *et al.* (1992) observaram aumento da atividade locomotora durante o período de exposição em ratos adultos expostos à fumaça do cigarro durante 20 minutos, duas vezes por dia durante 14 dias (PAULSON *et al.*, 1994; SUEMARU *et al.*, 1992). Contudo, é importante destacar que as variações nas respostas podem ser decorrentes da diferença entre os animais ou mesmo dos diferentes protocolos, como a via, o tempo e a intensidade da exposição à fumaça do cigarro, bem como o período em que os ensaios foram realizados.



Em nosso trabalho os ensaios comportamentais foram realizados após o período de exposição e portanto, representam diferentes períodos de abstinências: 4 dias nas análises realizadas na infância, 20 dias na adolescência e 40 dias na fase adulta.

Além da atividade locomotora realizamos ensaios para avaliar a ansiedade em labirinto em cruz elevado e observamos diminuição da porcentagem de entrada e da distância percorrida nos braços abertos, o que indica que a fumaça do cigarro induz efeito ansiogênico nos animais. Nossos resultados corroboram os de Abreu-Villaça et al. (2013), que avaliaram os efeitos da exposição ao etanol e à fumaça do cigarro 2R1F na ansiedade de camundongos durante a adolescência (P30-P45). Os autores observaram que a fumaça do cigarro induziu efeito ansiolítico no final do período de exposição (P44), enquanto após um curto-período de abstinência (P49) houve efeito ansiogênico, ambos avaliados em labirinto em cruz elevado. Após longo período de abstinência (P74) nenhum efeito foi observado em labirinto em cruz elevado, contudo, animais expostos à associação etanol e fumaça do cigarro apresentaram diminuição na locomoção central em campo aberto, o que, segundo os autores, sugere efeito ansiogênico.

No presente trabalho também observamos diminuição na locomoção central em campo aberto, resultado coerente com o observado em labirinto em cruz elevado e que também pode sugerir maior comportamento de medo nesses animais.

Com relação aos dados bioquímicos, nossos resultados demonstram que a exposição à fumaça do cigarro durante o início do período pós-natal induz diminuição de BDNF na infância e estes dados são consistentes com a diminuição nos níveis proteicos de sinapsina e sinaptofisina, além do prejuízo no aprendizado e memória observado nesta fase. Contudo, também observamos que a exposição à

fumaça do cigarro durante o início do período pós-natal induz diminuição nos níveis proteicos de sinapsina e de sinaptofisina na adolescência e na fase adulta, enquanto não há diferença nos níveis de BDNF. Esses resultados sugerem que a transmissão pré-sináptica pode estar envolvida na consolidação de informações novas, já que houve prejuízo tanto na memória de referência quanto na operacional espacial.

O BDNF tem papel significativo na promoção do desenvolvimento normal do sistema nervoso e na regulação da sobrevivência celular (TANG; MACHAALANI; WATERS, 2008), além de estar envolvido na plasticidade sináptica e em mecanismos de aprendizagem, como potencial de longa duração e consolidação da memória (LANG et al., 2007; THOENEN, 1995). Aguado et al. (2003) realizaram um estudo com embriões (18 dias) de camundongos transgênicos que possuíam uma superexpressão de BDNF e demonstraram que esse fator neurotrófico promove aumento do número de sinapses no início do processo de desenvolvimento do sistema nervoso. Ainda, ratos com uma deleção na sequência de codificação do BDNF (KORTE et al., 1995) e camundongos *knockout* para os receptores TrkB (MANABE, 2002), que são ativados pelo BDNF, apresentam redução da potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo, com conseqüente prejuízo ao processo de aprendizagem e memória (KORTE et al., 1995; MANABE, 2002).

Tsai et al. (2013) demonstraram que o BDNF promove sinaptogênese por meio do aumento da expressão de sinapsina e de PSD95 (TSAI et al., 2013), enquanto Jovanovic et al. (2000) observaram que a estimulação da liberação de glutamato mediada pelo BDNF foi fortemente atenuada em camundongos *knockout* para sinapsina I e/ou sinapsina II (JOVANOVIC et al., 2000). Esses resultados são condizentes com estudos que demonstram que camundongos *knockout* para BDNF

apresentam diminuição da expressão de sinaptofisina e sinaptobrevina (HU; NIKOLAKOPOULOU; COHEN-CORY, 2005; TYLER; POZZO-MILLER, 2001).

A diminuição das proteínas sinápticas nas diferentes idades avaliadas pode estar relacionada à deficiência no aprendizado e consolidação de memória. De fato, diversos trabalhos correlacionam alterações na memória com proteínas sinápticas. Frick et al. (2003) demonstraram que camundongos fêmeas submetidos à ambiente enriquecido apresentam melhor desempenho em labirinto aquático de Morris no envelhecimento, além de maiores níveis proteicos de sinaptofisina (FRICK; FERNANDEZ, 2003). Os autores sugerem uma associação entre o aumento da sinaptofisina e a memória. De acordo com Black et al. (1990), o aprendizado motor está relacionado ao aumento da sinaptogênese (BLACK et al., 1990).

Schmitt et al. (2009) realizaram detalhada análise comportamental em camundongos nocaute para sinaptofisina. Os autores observaram que os animais nocaute apresentaram maior atividade exploratória em campo aberto enriquecido, contudo, detectaram deficiências na aprendizagem e memória, com maior evidência na exploração de novos objetos e na aprendizagem espacial. Essas alterações provavelmente não estão relacionadas a alterações na ansiedade ou prejuízo nas funções visuais, já que os ensaios realizados em labirinto em cruz elevado e eletroretinograma não apresentaram nenhuma alteração (SCHMITT et al., 2009).

Gómez-Pinilla et al. (2001) mostraram que a tarefa realizada em labirinto aquático de Morris para avaliar o aprendizado e a memória espacial aumenta a expressão de receptores neurotróficos e de sinapsina I. Segundo John et al. (2009) a expressão de diferentes isoformas de sinapsinas no hipocampo correlacionam-se à melhora da memória espacial induzida pelo SGS742, um antagonista de receptor GABA<sub>b</sub> (GÓMEZ-PINILLA; SO; KESSLAK, 2001; JOHN et al., 2009).

HO et al. (2012), demonstraram que ratos Sprague-Dawley (SD) adultos expostos à fumaça passiva do cigarro 1 hora/dia durante 8 semanas apresentaram aumento significativo do estresse oxidativo no hipocampo, além de diminuição de proteínas pré-sinápticas, como sinaptofisina e sinapsina I e da proteína pós-sináptica PSD95. Segundo os autores estas mudanças sugerem que a exposição crônica ao cigarro induz degeneração sináptica e pode ser um fator de risco para a doença de Alzheimer (HO et al., 2012).

Estudos em camundongos nocaute para sinapsinas I e II mostraram que essas proteínas não são essenciais para a sobrevivência ou para a exocitose das vesículas sinápticas. Contudo, são essenciais para a manutenção do número de vesículas sinápticas e para a regulação da plasticidade sináptica de curto prazo. A supressão das sinapsinas diminuiu o número de vesículas, sem alterar sua ligação e fusão à membrana pré sináptica (LI et al., 1995; ROSAHL et al., 1993; SUDHOF, 2004).

LIN et al. (2009) investigaram os efeitos do tolueno em cultura primária de hipocampo de ratos e observaram diminuição significativa de sinapsina sem que houvesse morte celular. Os resultados indicam que o tolueno pode alterar a expressão e a localização de proteínas sinápticas essenciais, levando à ruptura na formação e na manutenção de sinapses (LIN et al., 2009). Bogen et al. (2009) demonstraram que as sinapsinas I e II modulam a função e a estrutura sináptica, como mudanças no número e na função das vesículas sinápticas, durante o desenvolvimento das sinapses glutamatérgicas no encéfalo de camundongos. Contudo, tais efeitos não são observados no início do período pós-natal (até P10), mas são evidentes durante o período mais ativo da sinaptogênese (P10-P20) (BOGEN et al., 2009).

A exocitose das vesículas sinápticas é mediada por um conjunto de proteínas de membrana denominado SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) receptors*). Entre elas pode-se citar a sinaptobrevina, que está localizada na membrana da vesícula sináptica. As sinaptofisinas, um grupo não-SNARE, são abundantes proteínas das vesículas sinápticas que se ligam diretamente a sinaptobrevina. Essa ligação é específica e exclusiva. A sinaptobrevina ligada à sinaptofisina não pode entrar no complexo SNARE e, inversamente, a sinaptobrevina, que faz parte de um complexo SNARE, não pode interagir com a sinaptofisina (CALAKOS; SCHELLERS, 1994; EDELMANN et al., 1995).

BACCI et al. (2001) demonstraram que o bloqueio crônico de receptores de glutamato causou diminuição do complexo sinaptobrevina/sinaptofisina e aumento na liberação de neurotransmissores. Estes resultados indicam que a sinaptofisina atua na regulação da disponibilidade de sinaptobrevina, e conseqüentemente, na regulação do complexo SNARE e na exocitose das vesículas sinápticas (BACCI et al., 2001; BECHER et al., 1999; SUDHOF, 2004). Becher et al. (1999) observaram que o complexo sinaptobrevina/sinaptofisina apresenta supersensibilidade durante o desenvolvimento do SNC. Contudo, os estudos demonstraram que, mesmo com a disponibilidade de ambas as proteínas na vesícula sináptica, a interação só ocorre após o início do processo de sinaptogênese (BECHER et al., 1999).

Em cultura primária de hipocampo de ratos, a exposição ao chumbo durante a sinaptogênese diminui a quantidade das proteínas sinaptofisina e sinaptobrevina resultando em deficiência na regulação da liberação de neurotransmissor. Esse efeito foi observado tanto em neurônios GABAérgicos como em glutamatérgicos (NEAL et al., 2010).

A diminuição da sinapsina e da sinaptofisina no 15º dia de vida, que segundo Bogen et al. (2009) é o período mais ativo da sinaptogênese em camundongos, pode acarretar diminuição no número de vesículas sinápticas, prejuízo na formação e manutenção das sinapses, diminuição do complexo sinaptobrevina/sinaptofisina em um momento em que este apresenta supersensibilidade e conseqüentemente, alterações na liberação de neurotransmissores em uma fase crítica do desenvolvimento do SNC (BOGEN et al., 2009).

Além da sinaptogênese, o desenvolvimento pós-natal do SNC de camundongos é caracterizado por processos como a mielinização, que é fundamental para o adequado funcionamento dos circuitos nervosos. Vale ressaltar que a vulnerabilidade da mielina aos fatores externos é mais acentuada nos períodos de síntese e deposição.

Em nosso trabalho observamos que a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal induz diminuição na porcentagem de fibras mielinizadas no nervo óptico na infância, sendo que há reversão na adolescência e na fase adulta. Como esperado, observamos aumento da área do nervo óptico na adolescência e na fase adulta nos animais dos grupos controles, demonstrando o desenvolvimento do nervo óptico. Contudo, nos animais adolescentes expostos à fumaça do cigarro não houve aumento da área em relação à infância, sugerindo um possível dano ao desenvolvimento nessa fase. Esse efeito é revertido nos animais adultos, já que há aumento da área do nervo óptico dos animais de 65 dias em relação aos animais de 15 e 35 dias expostos à fumaça do cigarro.

Os resultados obtidos na porcentagem de fibras mielinizadas no nervo óptico nos animais do grupo controle estão de acordo com dados encontrados em

trabalhos de referência nessa área (GYLLENSTEN; MALMFORS, 1963; TENNEKOON et al., 1977).

Gyllenstern e Malmfors (1963) avaliaram a influência da ausência de luz no processo de mielinização do nervo óptico de camundongos. Os animais foram deixados em ambiente escuro após o nascimento e os autores observaram que com cinco dias de idade apenas fibras não mielinizadas estavam presentes no nervo óptico. Segundo os autores, entre o 5º e o 15º dia de vida a mielinização ocorre a um ritmo lento, seguido por um rápido aumento no número de fibras mielinizadas entre o 20º e o 30º dia de vida (de cerca de 22.000 para 25.000). Após este período o processo de mielinização ocorre de forma lenta e contínua, sendo que nos animais adultos não são observadas fibras amielínicas (GYLLENSTEN; MALMFORS, 1963)

Tennekoon et al. (1977) descreveram o processo de mielinização pós-natal no nervo óptico de ratos por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Em micrografias eletrônicas é possível observar axônios em diferentes estágios de mielinização. Os autores observaram que no décimo dia de vida pós-natal (P10) aproximadamente 15% dos axônios estão mielinizados, enquanto que no décimo quinto dia, 30% dos axônios iniciaram o processo de mielinização (TENNEKOON et al., 1977).

O processo de mielinização no nervo óptico de camundongos progride rapidamente nos primeiros dias de vida pós-natal, contudo, axônios não mielinizados são predominantes até a segunda semana de vida (DANGATA; FINDLATER; KAUFMAN, 1996), assim como demonstrado no presente trabalho, em que animais controle de 15 dias apresentam cerca de 30% de fibras mielínicas, enquanto os de 35 dias apresentam cerca de 80%.

Matthieu et al. (1986) demonstraram que a PBM é responsável pela manutenção da estabilidade metabólica e pela estrutura compacta da mielina, uma vez que camundongos com deficiência na síntese da PBM apresentaram menor grau de compactação das lamelas. Além disso, a PBM interfere na síntese de outras proteínas que fazem parte da mielina, como por exemplo, a glicoproteína associada a mielina (MAG) (MATTHIEU et al., 1986; VALENTE, 2006).

Em nosso trabalho realizamos a quantificação da PBM em regiões encefálicas que apresentam diferentes razões entre as substâncias branca e cinzenta: cerebelo, telencéfalo, diencéfalo e tronco encefálico (FERNÁNDEZ et al., 2010). O tronco encefálico, formado pelo bulbo, ponte e mesencéfalo, é um conjunto complexo de fibras e células e possui alta razão entre as substâncias branca e cinzenta. No cerebelo, a distribuição da substância branca é semelhante à do telencéfalo; enquanto o diencéfalo é a região analisada de menor razão entre as substâncias branca e cinzenta, o que pode explicar a ausência de efeitos induzidos pela fumaça do cigarro nos níveis proteicos da PBM nessa estrutura (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008; FERNÁNDEZ et al., 2010).

Nossos resultados também indicam que na adolescência (P35) a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal induz diminuição nos níveis proteicos da PBM no telencéfalo e no tronco encefálico. É importante salientar que a PBM apresenta pico de expressão e de níveis proteicos por volta do 30º dia pós-natal em roedores (FERNÁNDEZ et al., 2010) e portanto, a fumaça do cigarro induz prejuízo à PBM em uma fase crítica do desenvolvimento do SNC.

Ainda, observamos que a fumaça do cigarro induz aumento nos níveis proteicos da PBM no cerebelo na infância e diminuição na fase adulta. Embora não haja alterações nos níveis proteicos de PBM no cerebelo durante a adolescência, o



processo de mielinização nessa estrutura parece ser mais sensível à fumaça do cigarro, uma vez que é a única em que os efeitos não são revertidos na fase adulta.

Em resumo, este é o primeiro trabalho que avalia os efeitos da fumaça do cigarro no início do período pós-natal de roedores na infância e suas consequências na adolescência e na fase adulta, por meio de ensaios comportamentais e bioquímicos, com ênfase nos principais processos dessa fase: sinaptogênese e mielinização. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal causa prejuízo ao desenvolvimento normal do SNC, uma vez que houve aumento da ansiedade, prejuízo na atividade locomotora, no aprendizado e memória e nos processos de sinaptogênese e mielinização, sendo que diversos efeitos observados não são revertidos na adolescência ou mesmo na fase adulta.

**CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que:

1. Os animais expostos à fumaça do cigarro tiveram retardo no crescimento, já que apresentaram diminuição no ganho de peso na infância e na adolescência.

2. A exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal induz prejuízo no aprendizado e memória e na transmissão sináptica em um período crítico do desenvolvimento do SNC, sendo que diversos efeitos observados não são revertidos na adolescência ou mesmo na fase adulta.

3. A exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal causa prejuízo ao desenvolvimento de estruturas críticas para a atividade locomotora, como o cerebelo e o estriado, e esse efeito pode ser associado à diminuição da atividade locomotora observado na infância e na adolescência.

4. A exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal causa prejuízo ao desenvolvimento normal do processo de mielinização no SNC, contudo, há reversão da maioria dos efeitos na fase adulta.

## REFERÊNCIAS

## 7. REFERÊNCIAS

- ABREU-VILLAÇA, Y.; FILGUEIRAS, C.C.; GUTHIERREZ, M.; MEDEIROS, A.H.; MATTOS, M.A.; PEREIRA, M.S.; MANHÃES, A.C.; KUBRUSLY, R.C. Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus. **Nicotine & Tobacco Research**, v.12, n.7, p.776–780, 2010.
- ABREU-VILLAÇA, Y.; CAVINA, C.C.; RIBEIRO-CARVALHO, A.; CORREA-SANTOS, M.; NAIFF, V.F.; FILGUEIRAS, C.C.; MANHÃES, A.C. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol during adolescence leads to short- and long-term modulation of anxiety-like behavior. **Drug and Alcohol Dependence**. In press. 2013.
- AGUADO, F.; CARMONA, M.A.; POZAS, E.; AGUILÓ, A.; MARTÍNEZ-GUIJARRO, F.J.; ALCANTARA, S.; BORRELL, V.; YUSTE, R.; IBAÑEZ, C.F.; SORIANO, E. BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2. **Development**, v.130, n.7, p.1267–1280, 2003.
- AMOS-KROOHS, R.M.; WILLIAMS, M.T.; BRAUN, A.A.; GRAHAM, D.L.; WEBB, C.L.; BIRTLES, T.S.; GREENE, R.M.; VORHEES, C.V.; PISANO, M.M. Neurobehavioral phenotype of C57BL/6J mice prenatally and neonatally exposed to cigarette smoke. **Neurotoxicology and Teratology**, v.35, p.34–45, 2013.
- ANDRADE, A.G.; DUARTE, P.C.A.V.; OLIVEIRA, L.G. **I Levantamento nacional sobre o uso de álcool, tabaco e outras drogas entre universitários das 27 capitais brasileiras**. Brasília: Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas, 2010. v.1, 284p.
- BACCI, A.; COCO, S.; PRAVETTONI, E.; SCHENK, U.; ARMANO, S.; FRASSONI, C.; VERDERIO, C.; DE CAMILLI, P.; MATTEOLI, M. Chronic blockade of glutamate receptors enhances presynaptic release and downregulates the interaction between synaptophysin-synaptobrevin-vesicle-associated membrane protein 2. **Journal of Neuroscience**, v.21, n.17, p.6588–6596, 2001.
- BADDELEY, A. Working memory components of working memory individual differences in working memory the slave systems of working memory. **Science**, v.255, p.556–559, 1992.
- BANDIERA, F.C.; RICHARDSON, A.K.; LEE, D.J.; HE, J.P.; MERIKANGAS, K.R. Secondhand smoke exposure and mental health among children and adolescents. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v.165, n.4, p.332–338, 2011.
- BAYER, S.; ALTMAN, J.; RUSSO, R.J.; ZHANG, X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. **Neurotoxicology**, v.14, n.1, p.83–144, 1993.

- BAYER, S.A. Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. **Journal of Comparative Neurology**, v.190, n.1, p.115–134, 1980.
- BEAR, M.; CONNORS, B.; PARADISO, M. **Neurociências**: desvendando o sistema nervoso. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 896p.
- BECHER, A.; DRENCKHAHN, A.; PAHNER, I.; MARGITTAI, M.; JAHN, R.; AHNERT-HILGER, G. The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. **Journal of Neuroscience**, v.19, n.6, p.1922–1931, 1999.
- BENFENATI, F.; GREENGARD, P.; BRUNNER, J.; BÄHLER, M. Electrostatic and hydrophobic interactions of synapsin I and synapsin I fragments with phospholipid bilayers. **Journal of Cell Biology**, v.108, n.5, p.1851–1862, 1989.
- BENNETT, D.S.; MOHAMED, FB.; CARMODY, DP.; MALIK, M.; FARO, SH.; LEWIS, M. Prenatal tobacco exposure predicts differential brain function during working memory in early adolescence: a preliminary investigation. **Brain Imaging and Behavior**, v.7, n.1, p.49–59, 2013.
- BERRY, R.B.; MATTHEWS, D.B. Acute ethanol administration selectively impairs spatial memory in C57BL/6J mice. **Alcohol**, v.32, n.1, p.9–18, 2004.
- BEUTLER, E.; WEST, C. Simplified determination of carboxyhemoglobin. **Clinical Chemistry**, v.30, n.6, p.871–874, 1984.
- BISELLI, P.J.C.; LOPES, F.D.; MORIYA, H.T.; RIVERO, D.H.; TOLEDO, A.C.; SALDIVA, P.H.; MAUAD, T.; MARTINS, M.A. Short-term exposure of mice to cigarette smoke and/or residual oil fly ash produces proximal airspace enlargements and airway epithelium remodeling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.44, n.5, p.460–468, 2011.
- BLACK, J.E.; ISAACS, K.R.; ANDERSON, B.J.; ALCANTARA, A.A.; GREENOUGH, W.T. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, n.14, p.5568–5572, 1990.
- BOGEN, I.L.; JENSEN, V.; HVALBY, O.; WALAAS, S.I. Synapsin-dependent development of glutamatergic synaptic vesicles and presynaptic plasticity in postnatal mouse brain. **Neuroscience**, v.158, n.1, p.231–241, 2009.
- CALAKOS, N.; SCHELLERS, R.H. Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.40, p.24534–24537, 1994.
- CARVALHO, L.M.T.; PEREIRA, E.D.B. Morbidade respiratória em crianças fumantes passivas. **Jornal de Pneumologia**, v.28, n.1, p.8–14, 2002.
- CHEN, H.; VLAHOS, R.; BOZINOVSKI, S.; JONES, J.; ANDERSON, G.P.; MORRIS, M.J. Effect of short-term cigarette smoke exposure on body weight, appetite and

- brain neuropeptide Y in mice. **Neuropsychopharmacology**, v.30, n.4, p.713–719, 2005.
- CHO, S.C.; HONG, Y.C.; KIM, J.W.; PARK, S.; PARK, M.H.; HUR, J.; PARK, E.J.; HONG, S.B.; LEE, J.H.; SHIN, M.S.; KIM, B.N.; YOO, H.J.; CHO, I.H.; BHANG, S.Y.; HAHN, S. Association between urine cotinine levels, continuous performance test variables, and attention deficit hyperactivity disorder and learning disability symptoms in school-aged children. **Psychological Medicine**, v.43, n.1, p.209–219, 2013.
- CLANCY, B.; CHARVET, C.J.; DARLINGTON, R.B.; FINLAY, B.L.; WORKMAN, A. **Translating time**. Disponível em: <http://translatingtime.net/home>. Acesso em: 26 jun. 2013.
- CRUZ, A.P.M.; ZAGROSSI Jr., H.; GRAEFF, F.G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v.13, n.3, p.269–278, 1997.
- CUTLER, A.R.; WILKERSON, A.E.; GINGRAS, J.L.; LEVIN, E.D. Prenatal cocaine and/or nicotine exposure in rats: preliminary findings on long-term cognitive outcome and genital development at birth. **Neurotoxicology and Teratology**, v.18, n.6, p.635–643, 1996.
- DANGATA, Y.Y.; FINDLATER, G.S.; KAUFMAN, M.H. Postnatal development of the optic nerve in (C57BL x CBA) F1 hybrid mice: general changes in morphometric parameters. **Journal of Anatomy**, v.189, (pt.1), p.117–125, 1996.
- DIAMOND, A. Close interrelation of motor development and cognitive development and of the cerebellum and prefrontal cortex. **Child Development**, v.71, n.1, p.44–56, 2000.
- DOBBING, J. The later development of the brain and its vulnerability. In: DAVIS, J.; DOBBING, J., eds. **Scientific foundations of paediatrics**. 2.ed. Londo, Baltimore: Heinemann, 1982. p.744–759.
- DORETTO, S.; MALERBA, M.; RAMOS, M.; IKRAR, T.; KINOSHITA, C.; DE MEI, C.; TIROTTA, E.; XU, X.; BORRELLI, E. Oligodendrocytes as regulators of neuronal networks during early postnatal development. **PloS One**, v.6, n.5, p.e19849, 2011.
- DWYER, J.B.; BROIDE, R.S.; LESLIE, F.M. Nicotine and brain development. **Birth Defects Research, Part C: Embryo Today - Reviews**, v.84, n.1, p.30–44, 2008.
- DWYER, J.B.; MCQUOWN, S.C.; LESLIE, F.M. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. **Pharmacology & Therapeutics**, v.122, n.2, p.125–139, 2009.
- EDELMANN, L.; HANSON, P.I.; CHAPMAN, E.R.; JAHN, R. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. **EMBO Journal**, v.14, n.2, p.224–231, 1995.

- EPPOLITO, A.K.; SMITH, R.F. Long-term behavioral and developmental consequences of pre- and perinatal nicotine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.85, n.4, p.835–841, 2006.
- ERNST, M.; MOOLCHAN, E.T.; ROBINSON, M.L. Behavioral and neural consequences of prenatal exposure to nicotine. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v.40, n.6, p.630–641, 2001.
- EVANS, A.E.; KELLY, C.M.; PRECIOUS, S.V.; ROSSER, A.E. Molecular regulation of striatal development: a review. **Anatomy Research International**, v.2012, n.106529, p.1-14, 2012.
- FELESZKO, W.; ZAWADZKA-KRAJEWSKA, A.; MATYSIAK, K.; LEWANDOWSKA, D.; PERADZYŃSKA, J.; DINH, Q.T.; HAMELMANN, E.; GRONEBERG, D.A.; KULUS, M. Parental tobacco smoking is associated with augmented IL-13 secretion in children with allergic asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.117, n.1, p.97–102, 2006.
- FENTRESS, J.C.; STANFIELD, B.B.; COWAN, W.M. Observation on the development of the striatum in mice and rats. **Anatomy and Embryology**, v.163, n.3, p.275–298, 1981.
- FERNÁNDEZ, M.; PARADISI, M.; D'INTINO, G.; DEL VECCHIO, G.; SIVILIA, S.; GIARDINO, L.; CALZÀ, L. A single prenatal exposure to the endocrine disruptor 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters developmental myelination and remyelination potential in the rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v.115, n.4, p.897–909, 2010.
- FERREIRA, L.T. **Sinais de tráfego envolvidos no endereçamento do Transportador Vesicular de Acetilcolina (VACHT)**. Belo Horizonte, 2006. 137p. Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais.
- FRANKISH, H.M.; DRYDEN, S.; WANG, Q.; BING, C.; MACFARLANE, I.A.; WILLIAMS, G. Nicotine administration reduces neuropeptide Y and neuropeptide Y mRNA concentrations in the rat hypothalamus: NPY may mediate nicotine's effects on energy balance. **Brain Research**, v.694, n.1/2, p.139–146, 1995.
- FRICK, K.M.; FERNANDEZ, S.M. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. **Neurobiology of Aging**, v.24, n.4, p.615–626, 2003.
- FRIED, P.A.; WATKINSON, B. Differential effects on facets of attention in adolescents prenatally exposed to cigarettes and marijuana. **Neurotoxicology and Teratology**, v.23, n.5, p.421–430, 2001.
- FULLER, B.F.; CORTES DF.; LANDIS MK.; YOHANNES H.; GRIFFIN HE.; STAFFLINGER JE.; BOWERS MS.; LEWIS MH.; FOX MA.; OTTENS AK. Exposure of rats to environmental tobacco smoke during cerebellar development alters behavior and perturbs mitochondrial energetics. **Environmental Health Perspectives**, v.120, n.12, p.1684–1691, 2012.



- GAWORSKI, C.L.; CARMINES, E.L.; FAQI, A.S.; RAJENDRAN, N. In utero and lactation exposure of rats to 1R4F reference cigarette mainstream smoke: effect on prenatal and postnatal development. **Toxicological Sciences**, v.79, n.1, p.157–169, 2004.
- GIMENES Jr., J.A. **Busca alimentar, memória espacial e ansiedade em ratos: possível participação do núcleo mamilar medial**. São Paulo, 2008. 163p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.
- GÓMEZ-PINILLA, F.; SO, V.; KESSLAK, J.P. Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. **Brain Research**, v.904, n.1, p.13–19, 2001.
- GOOD, C.H.; BAY, K.D.; BUCHANAN, R.A.; MCKEON, K.A.; SKINNER, R.D.; GARCIA-RILL, E. Prenatal exposure to cigarette smoke affects the physiology of pedunculo-pontine nucleus (PPN) neurons in development. **Neurotoxicology and Teratology**, v.28, n.2, p.210–219, 2006.
- GOV SP - LEI ANTIFUMO. Disponível em: <http://www.leiantifumo.sp.gov.br/>. Acesso em: 25 maio 2013.
- GYLLENSTEN, L.; MALMFORS, T. Myelination of the optic nerve and its dependence on visual function--a quantitative investigation in mice. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v.11, pt.1, p.255–266, 1963.
- HO, Y.-S.; YANG, X.; YEUNG, S.C.; CHIU, K.; LAU, C.F.; TSANG, A.W.T.; MAK, J.C.W.; CHANG, R.C.C. Cigarette smoking accelerated brain aging and induced pre-Alzheimer-like neuropathology in rats. **PloS One**, v.7, n.5, p.e36752, 2012.
- HOSAKA, M.; HAMMER, R.E.; SÜDHOF, T.C. A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. **Neuron**, v.24, n.2, p.377–387, 1999.
- HU, B.; NIKOLAKOPOULOU, A.M.; COHEN-CORY, S. BDNF stabilizes synapses and maintains the structural complexity of optic axons *in vivo*. **Development**, v.132, n.19, p.4285–4298, 2005.
- INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (Brasil). **Pesquisa Nacional por amostra de domicílios – tabagismo**: 2008. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. 128p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/inca/Arquivos/publicacoes/tabagismo.pdf>.
- INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (Brasil). **BRASIL: advertências sanitárias nos produtos de tabaco 2009**. Rio de Janeiro: INCA, 2008. 59p. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/brasil\\_advertencias\\_sanitarias\\_nos\\_produtos\\_de\\_tabaco2009b.pdf](http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/brasil_advertencias_sanitarias_nos_produtos_de_tabaco2009b.pdf).
- INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil); PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Global adult tobacco survey Brazil 2008. Report**. Rio de Janeiro: INCA 2010. 208p. Disponível em: [http://www.who.int/tobacco/surveillance/en\\_tfi\\_gats\\_2010\\_brazil.pdf](http://www.who.int/tobacco/surveillance/en_tfi_gats_2010_brazil.pdf).

- JACOBSON, M. Formation of dendrites and development of synaptic connections. **Developmental neurobiology**. 3.ed. New York: Plenum Press, 1991. cap.6, p.223–283.
- JINDAL, S.; GUPTA, D. The relationship between tobacco smoke & bronchial asthma. **Indian Journal of Medical Research**, v.120, n.4, p.443–453, 2004.
- JO, Y.-H.; TALMAGE, D.A.; ROLE, L.W. Nicotinic receptor-mediated effects on appetite and food intake. **Journal of Neurobiology**, v.53, n.4, p.618–632, 2002.
- JOHN, J.P.P.; SUNYER, B.; HÖGER, H.; POLLAK, A.; LUBEC, G. Hippocampal synapsin isoform levels are linked to spatial memory enhancement by SGS742. **Hippocampus**, v.19, n.8, p.731–738, 2009.
- JOVANOVIĆ, J.N.; CZERNIK, A.J.; FIENBERG, A.A.; GREENGARD, P.; SIHRA, T.S. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. **Nature Neuroscience**, v.3, n.4, p.323–329, 2000.
- KANDEL, E.R.; SIEGELBAUM, S.A. Liberação de transmissores. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M., eds. **Princípios de neurociência**. 4.ed. Barueri: Manole, 2003. p.253–279.
- KIM, J.; UDO, H.; LI, H.L.; YOUN, T.Y.; CHEN, M.; KANDEL, E.R.; BAILEY, C.H. Presynaptic activation of silent synapses and growth of new synapses contribute to intermediate and long-term facilitation in *Aplysia*. **Neuron**, v.40, n.1, p.151–165, 2003.
- KORTE, M.; CARROLL, P.; WOLF, E.; BREM, G.; THOENEN, H.; BONHOEFFER, T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, n.19, p.8856–8860, 1995.
- LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680–685, 1970.
- LANG, U.E.; SANDER, T.; LOHOFF, F.W.; HELLWEG, R.; BAJBOUJ, M.; WINTERER, G.; GALLINAT, J. Association of the met66 allele of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with smoking. **Psychopharmacology**, v.190, n.4, p.433–439, 2007.
- LEVIN, E.D.; BRIGGS, S.J.; CHRISTOPHER, N.C.; ROSE, J.E. Prenatal nicotine exposure and cognitive performance in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v.15, n.4, p.251–260, 1993.
- LI, L.; CHIN, L.S.; SHUPLIAKOV, O.; BRODIN, L.; SIHRA, T.S.; HVALBY, O.; JENSEN, V.; ZHENG, D.; MCNAMARA, J.O.; GREENGARD, P.; ANDERSEN, P. Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, n.20, p.9235–9239, 1995.

- LI, M.D.; KANE, J.K.; PARKER, S.L.; MCALLEN, K.; MATTA, S.G.; SHARP, B.M. Nicotine administration enhances NPY expression in the rat hypothalamus. **Brain Research**, v.867, n.1/2, p.157–164, 2000.
- LIN, H.-M.; LIU, C.Y.; JOW, G.M.; TANG, C.Y. Toluene disrupts synaptogenesis in cultured hippocampal neurons. **Toxicology Letters**, v.184, n.2, p.90–96, 2009.
- MALHEIRO, A.C.C.G.C. **Determinação espectrofotométrica da carboxihemoglobina em indivíduos expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono**. São Paulo, 1991. 125p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- MAN, C.N.; GAM, L.H.; ISMAIL, S.; LAJIS, R.; AWANG, R. Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.844, n.2, p.322–327, 2006.
- MANABE, T. Does BDNF have pre- or postsynaptic targets? **Science**, v.295, n.5560, p.1651–1653, 2002.
- MARTINS, A.P. **Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos**. São Paulo, 2009. 85p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.
- MATT, G.E.; QUINTANA, P.J.E.; ZAKARIAN, J.M.; FORTMANN, A.L.; CHATFIELD, D.A.; HOH, E.; URIBE, A.M.; HOVELL, M.F. When smokers move out and non-smokers move in: residential thirdhand smoke pollution and exposure. **Tobacco Control**, v.20, n.1, p.e1-e8, 2011.
- MATTHEWS, D.A.; NADLER, J.V.; LYNCH, G.S.; COTMAN, C.W. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. I. histochemical demonstration of acetylcholinesterase activity. **Developmental Biology**, v.36, n.1, p.130–141, 1974.
- MATTHIEU, J.M.; ROCH, J.M.; OMLIN, F.X.; RAMBALDI, I.; ALMAZAN, G.; BRAUN, P.E. Myelin instability and oligodendrocyte metabolism in myelin-deficient mutant mice. **Journal of Cell Biology**, v.103, n.6, pt.2, p.2673–2682, 1986.
- MELLO, P.R.; OKAY, T.S.; DORES, E.F.G.C.; BOTELHO, C. Avaliação de um sistema de exposição tabágica passiva em modelo experimental utilizando cotinina e carboxiemoglobina como marcadores de exposição. **Pulmão RJ**, v.14, n.3, p.228–236, 2005.
- MITCHELL, E.A.; MILERAD, J. Smoking and the sudden infant death syndrome. **Reviews on Environmental Health**, v.21, n.2, p.81–103, 1999.
- MOURA-RIBEIRO, M.V.L.; GONÇALVES, V., eds. **Neurologia do desenvolvimento da criança**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. 485p.

- MULLANY, P.M.; LYNCH, M.A. Evidence for a role for synaptophysin in expression of long-term potentiation in rat dentate gyrus. **Neuroreport**, v.9, n.11, p.2489–2494, 1998.
- NAVARRO, H.A.; SEIDLER, F.J.; SCHWARTZ, R.D.; BAKER, F.E.; DOBBINS, S.S.; SLOTKIN, T.A. Prenatal exposure to nicotine impairs nervous system development at a dose which does not affect viability or growth. **Brain Research Bulletin**, v.23, n.3, p.187–192, 1989.
- NEAL, A.P.; STANSFIELD, K.H.; WORLEY, P.F.; THOMPSON, R.E.; GUILARTE, T.R. Lead exposure during synaptogenesis alters vesicular proteins and impairs vesicular release: potential role of NMDA receptor-dependent BDNF signaling. **Toxicological Sciences**, v.116, n.1, p.249–263, 2010.
- O'KEEFE, J.; NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford: Oxford University Press, 1978. 570p.
- OBBERG, M.; JAAKOLA, M.S.; WOODWARD, A.; PERUGA, A.; PRUSS-USTUN, A. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. **Lancet**, v.377, n.9760, p.139–146, 2011.
- OBOT, C.J.; LEE, K.; FUCIARELLI, A.; RENNE, R.; MCKINNEY, W. Characterization of mainstream cigarette smoke-induced biomarker responses in ICR and C57Bl/6 mice. **Inhalation Toxicology**, v.16, n.10, p.701–719, 2004.
- OMS - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fresh and alive**: mPower. Geneva: World Health Organization, 2008. 342p. (WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The MPower package). Disponível em: [http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower\\_report\\_full\\_2008.pdf](http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_full_2008.pdf).
- OMS - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mortality attributable to tobacco**. Geneva: World Health Organization, 2012. 396p. (WHO Global Report). Disponível em: [http://www.who.int/tobacco/publications/surveillance/fact\\_sheet\\_mortality\\_report.pdf](http://www.who.int/tobacco/publications/surveillance/fact_sheet_mortality_report.pdf).
- PAULSON, R.; SHANFELD, J.; VORHEES, C.V.; COLE, J.; SWEAZY, A.; PAULSON, J.O. Behavioral effects of smokeless tobacco on the neonate and young Sprague Dawley rat. **Teratology**, v.49, n.4, p.293–305, 1994.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, n.3, p.149–167, 1985.
- PENNUTO, M.; BONANOMI, D.; BENFENATI, F.; VALTORTA, F. Synaptophysin I controls the targeting of VAMP2/Synaptobrevin II to synaptic vesicles. **Molecular Biology of the Cell**, v.14, n.12, p.4909–4919, 2003.
- PICÓN, F.R.L. **Neurofilament proteins in the postnatal rat hippocampus**: developmental expression and changes in experimental epilepsy. Turku: University of Turku, 2008. 90p.

- PIERIBONE, V.; SHUPLIAKOV O.; BRODIN L.; HILFIKER-ROTHENFLUH S.; CZERNIK AJ.; GREENGARD P. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. **Nature**, v.375, n.6531, p.493–497, 1995.
- PINTO, M.F.T. **Custos de doenças tabaco - relacionadas**: uma análise sob a perspectiva da economia e da epidemiologia. Rio de Janeiro, 2007. 223p. Tese de Doutorado – Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz.
- PIOVESANA, A.; GONÇALVES, V. Neuroplasticidade. In: MOURA-RIBEIRO, M.V.L.; GONÇALVES, V.M.G., eds. **Neurologia do desenvolvimento da criança**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. p.130–141.
- PRECIOSO, J.; LOPEZ, M.J.; CALHEIROS, J.M.; MACEDO, M.; ARIZA, C.; SANCHEZ, F.; SCHIAFFINO, A.; FERNÁNDEZ, E.; NEBOT, M. Poluição do ar interior provocada pelo fumo do cigarro em locais públicos de Portugal. **Revista de Saúde Pública**, v.41, n.5, p.808–813, 2007.
- QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v.21, n.6, p.775–777, 2005.
- RICE, D.; BARONE Jr., S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v.108, suppl.3, p.511-533, 2000.
- ROSAHL, T.W.; GEPPERT, M.; SPILLANE, D.; HERZ, J.; HAMMER, R.E.; MALENKA, R.C.; SÜDHOF, T.C. Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. **Cell**, v.75, n.4, p.661–670, 1993.
- ROSEMBERG, J.; ROSEMBERG, A.M.A.; MORAES, M.A. **Nicotina**: droga universal. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria da Saúde, 2004. 178p. 239p.
- SANTOS, A. Aprendizagem e memória no labirinto aquático de Morris. In: XAVIER, G.F., org. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo: Plêiade, 1999. p.131–154.
- SCHMITT, U.; TANIMOTO, N.; SEELIGER, M.; SCHAEFFEL, F.; LEUBE, R.E. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. **Neuroscience**, v.162, n.2, p.234–243, 2009.
- SKORGE, T.D.; EAGAN, T.M.; EIDE, G.E.; GULSVIK, A.; BAKKE, P.S. The adult incidence of asthma and respiratory symptoms by passive smoking in uterus or in childhood. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.172, n.1, p.61–66, 2005.
- SLOTKIN, T.; ORBAND-MILLER, L.; QUEEN, K.L.; WHITMORE, W.L.; SEIDLER, F.J. Effects of prenatal nicotine exposure on biochemical development of rat brain regions: maternal drug infusions via osmotic minipumps. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.240, n.2, p.602–611, 1987.

- SLOTKIN, T.A. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.198, n.2, p.132–151, 2004.
- SORENSEN, C.; RASKIN, L.; SUH, Y. The effects of prenatal nicotine on radial-arm maze performance in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.40, n.4, p.991–993, 1991.
- STEINER, P.; HIGLEY, M.J.; XU, W.; CZERVIONKE, B.L.; MALENKA, R.C.; SABATINI, B.L. Destabilization of the postsynaptic density by PSD-95 serine 73 phosphorylation inhibits spine growth and synaptic plasticity. **Neuron**, v.60, n.5, p.788–802, 2008.
- SUDHOF, T.C. The synaptic vesicle cycle. **Annual Review of Neuroscience**, v.27, p.509–547, 2004.
- SUEMARU, K.; OISHI, R.; GOMITA, Y.; SAEKI, K.; ARAKI, Y. Effect of long-term cigarette smoke exposure on locomotor activity and brain monoamine levels in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.41, n.3, p.655–658, 1992.
- SWAN, G.E.; LESSOV-SCHLAGGAR, C.N. The effects of tobacco smoke and nicotine on cognition and the brain. **Neuropsychology Review**, v.17, n.3, p.259–73, 2007.
- SZAPACS, M.E.; MATHEWS, T.A.; TESSAROLLO, L.; ERNEST LYONS, W.; MAMOUNAS, L.A.; ANDREWS, A.M. Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. **Journal of Neuroscience Methods**, v.140, n.1/2, p.81–92, 2004.
- TANG, S.; MACHAALANI, R.; WATERS, K.A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and TrkB in the piglet brainstem after post-natal nicotine and intermittent hypercapnic hypoxia. **Brain Research**, v.1232, p.195–205, 2008.
- TENNEKOON, G.I.; COHEN, S.R.; PRICE, D.L.; MCKHANN, G.M. Myelinogenesis in optic nerve: a morphological, autoradiographic, and biochemical analysis. **Journal of Cell Biology**, v.72, n.3, p.604–616, 1977.
- THOENEN, H. Neurotrophins and neuronal plasticity. **Science**, v.270, n.5236, p.593–598, 1995.
- THOMSON, A.M. Molecular frequency filters at central synapses. **Progress in Neurobiology**, v.62, n.2, p.159–196, 2000.
- TORRES, L.H.L.; MOREIRA, W.L.; TAMBORELLI GARCIA, R.C.; ANNONI, R.; NICOLETTI CARVALHO, A.L.; TEIXEIRA, S.A.; PACHECO-NETO, M.; MUSCARÁ, M.N.; CAMARINI, R.; MELO LOUREIRO, A.P.; YONAMINE, M.; MAUAD, T.; MARCOURAKIS, T. Environmental tobacco smoke induces oxidative stress in distinct brain regions of infant mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues**, v.75, n.16/17, p.971–980, 2012.

- TSAI, Y.-W.; YANG, Y.R.; SUN, S.H.; LIANG, K.C.; WANG, R.Y. Post ischemia intermittent hypoxia induces hippocampal neurogenesis and synaptic alterations and alleviates long-term memory impairment. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.33, n.5, p.764–773, 2013.
- TYLER, W.J.; POZZO-MILLER, L.D. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. **Journal of Neuroscience**, v.21, n.12, p.4249–4258, 2001.
- VAGLENOVA, J.; BIRRU, S.; PANDIELLA, N.M.; BREESE, C.R. An assessment of the long-term developmental and behavioral teratogenicity of prenatal nicotine exposure. **Behavioural Brain Research**, v.150, n.1/2, p.159–170, 2004.
- VALADARES, C.T. **Efeitos da desnutrição protéica pós-natal no desempenho de ratos em diferentes tarefas de aprendizagem e memória**. Ribeirão Preto, 2006. 72p. Tese de Doutorado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.
- VALENTE, M. Mielinização do sistema nervoso. In: MOURA-RIBEIRO, M.V.L.; GONÇALVES, V.M.G., eds. **Neurologia do desenvolvimento da criança**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. p.109–129.
- VALERA, E.M.; FARAONE, S.V.; MURRAY, K.E.; SEIDMAN, L.J. Meta-analysis of structural imaging findings in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v.61, n.12, p.1361–1369, 2007.
- VALTORTA, F.; PENNUTO M.; BONANOMI D.; BENFENATI F. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? **BioEssays**, v.26, n.4, p.445–453, 2004.
- WEBER, D.N. Mechanisms of behavioral toxicology: an integrated approach. **American Zoologist**, v.37, n.4, p.343–345, 1997.
- WORKMAN, A.D.; CHARVET, C.J.; CLANCY, B.; DARLINGTON, R.B.; FINLAY, B.L. Modeling Transformations of Neurodevelopmental Sequences across Mammalian Species. **Journal of Neuroscience**, v.33, n.17, p.7368–7383, 2013.
- XAVIER, G.F.; OLIVEIRA-FILHO, F.J.; SANTOS, A.M. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in “place strategy” because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? **Hippocampus**, v.9, n.6, p.668–681, 1999.
- YOLTON, K.; DIETRICH, K.; AUINGER, P.; LANPHEAR, B.P.; HORNUNG, R. Exposure to environmental tobacco smoke and cognitive abilities among U.S. children and adolescents. **Environmental Health Perspectives**, v.113, n.1, p.98–103, 2004.
- ZAHALKA, E.A.; SEIDLER, F.J.; LAPPI, S.E.; YANAI, J.; SLOTKIN, T.A. Differential development of cholinergic nerve terminal markers in rat brain regions: implications for nerve terminal density, impulse activity and specific gene expression. **Brain Research**, v.601, n.1/2, p.221–229, 1993.

ZHAO, W.; CAVALLARO, S.; GUSEV, P.; ALKON, D.L. Nonreceptor tyrosine protein kinase pp60c-src in spatial learning: synapse-specific changes in its gene expression, tyrosine phosphorylation, and protein–protein interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.14, p.8098-8103, 2000.



**ANEXOS**

## APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 21/10/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1038/09**, intitulado: "**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) DE CAMUNDONGOS BALB/C EXPOSTOS À FUMAÇA DO CIGARRO NO INÍCIO DO PERÍODO PÓS-NATAL**" apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Thais Mauad**

Pesquisador (a) Executante: **Larissa Helena Lobo Torres**

CAPPesq, 21 de Outubro de 2009



**Prof. Dr. Eduardo Massad**  
**Presidente da Comissão de**  
**Ética para Análise de Projetos**  
**de Pesquisa**



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA/FCF/042010

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **“Avaliação do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) de camundongos Balb/c expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal”** (Protocolo nº 260), de responsabilidade da pesquisadora **Larissa Helena Lobo Torres** sob a orientação da Profa. Dra. Tânia Marcourakis, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL/COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 8 de fevereiro de 2010.

São Paulo, 09 de fevereiro de 2010.

  
Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal  
CEEA/FCF/USP