

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**GABRIEL ESTEVAM SANTOS DE AMORIM**

**EXPOSIÇÃO A NICOTINA DURANTE O PERÍODO PÓS-NATAL E NA FASE  
ADULTA: EFEITOS NA ATIVIDADE LOCOMOTORA E NA  
NEUROPLASTICIDADE DE CAMUNDONGOS SWISS**

Alfenas- MG

2021

**GABRIEL ESTEVAM SANTOS DE AMORIM**

**EXPOSIÇÃO A NICOTINA DURANTE O PERÍODO PÓS-NATAL E NA FASE  
ADULTA: EFEITOS NA ATIVIDADE LOCOMOTORA E NA  
NEUROPLASTICIDADE DE CAMUNDONGOS SWISS**

Dissertação de mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.  
Orientadora: Prof. Dra. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco  
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Vinícios Salles Dias

Alfenas- MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

A524e Amorim, Gabriel Estevam Santos de.  
Exposição a nicotina durante o período pós-natal e na fase adulta: efeitos na atividade locomotora e na neuroplasticidade de camundongos Swiss. / Gabriel Estevam Santos de Amorim. -- Alfenas/MG, 2021.  
71f.: il. –

Orientadora: Larissa Helena Lobo Torres Pacheco.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2021.  
Bibliografia.

1. Tabagismo. 2. Redução do Dano. 3. Nicotina. 4. Sensibilização Do Sistema Nervoso Central. I. Pacheco, Larissa Helena Lobo Torres. II. Título.

CDD-616.865

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis Goiatá  
Bibliotecária-Documentalista CRB/6-425

**GABRIEL ESTEVAM SANTOS DE AMORIM**

**"EXPOSIÇÃO A NICOTINA DURANTE O PERÍODO PÓS-NATAL E NA FASE ADULTA: EFEITOS NA ATIVIDADE LOCOMOTORA E NA NEUROPLASTICIDADE DE CAMUNDONGOS SWISS"**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2021

Profa. Dra. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Ana Carolina Cardoso dos Santos Durão  
Instituição: Universidade de São Paulo - USP

Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Cardoso dos Santos Durao, Usuário Externo**, em 20/05/2021, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Silvia Graciela Ruginsk Leitão, Professor do Magistério Superior**, em 20/05/2021, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Helena Lobo Torres Pacheco, Professor do Magistério Superior**, em 20/05/2021, às 18:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0468294** e o código CRC **C0C82E8C**.

Dedico este trabalho à Deus, por ter me preparado para cada batalha que encarei ao longo da vida. Sempre me mostrando, o melhor caminho ao longo dessa jornada

Áo meu pai Amorim e a minha mãe Raquel, por caminharem junto comigo nessa estrada tortuosa, nunca me abandonaram, e sempre mostrando que tudo na vida tem um motivo.

Á meu irmão Gustavo, que sempre esteve ao meu lado nessa jornada me mostrando, que eu sou capaz de lutar todas as batalhas impostas ao longo da vida

Á todos vocês meu profundo amor e gratidão

À Larissa

todas as palavras que existem no mundo são poucas para expressar a minha gratidão, que tenho por você e por ter me proporcionado essa experiência incrível. Obrigado pela oportunidade, pela confiança, pela dedicação incondicional, pela paciência e pela compreensão que possibilitou o meu crescimento profissional. Tenho em você, uma inspiração de profissionalismo que levarei ao longo de minha jornada.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado sabedoria, força durante toda essa caminhada, por sempre estar comigo, nos momentos de dificuldade durante todo o meu processo de amadurecimento.

À minha família por todo o apoio incondicional que obtive durante essa incrível jornada de conhecimento. Meu pai Amorim e minha mãe Rachel, por sempre me incentivarem a ser uma pessoa melhor, por estarem juntos comigo em todos os momentos difíceis e sempre me apoiarem nas minhas escolhas, me ajudando a tornar realidade os meus sonhos. Meu irmão Gustavo, que sempre esteve ao meu lado, não se importando o quão difícil fosse o caminho, pois ele sempre estava ao meu lado servindo de abrigo, conselheiro sempre me ajudando a me tornar uma pessoa melhor. Meu avô Genésio, que durante a sua vida teve uma participação contínua e fundamental, em minha vida, sempre me estimulando a buscar o conhecimento, mesmo estando no plano espiritual, seus princípios me guiaram durante essa estrada rumo ao amadurecimento.

À Professora Larissa, durante essa jornada que estivemos juntos você me ensinou a encarar desafios de frente, e a nunca desistir me mostrando que sou capaz de realizar todos os desafios que encontrei. Por todo, o carinho que teve comigo, seja durante as correções ou seja para me parabenizar, além de sempre ter exigido o melhor de mim, sabendo que eu era capaz. Obrigado Professora Larissa, por ter sido a melhor orientadora e ter me transmitido todo o conhecimento para que possa dar continuidade em minha carreira, você sempre terá minha gratidão eterna.

Ao Professor Marcos, pelo acolhimento durante a minha jornada, sempre oferecendo ajuda e repassando seus conhecimentos, para que eu pudesse desenvolver o meu projeto da melhor maneira possível.

À Professora Carla, por sempre estar disposta a me auxiliar em meus experimentos, seja com dicas ou até mesmo na discussão de meus resultados além de sempre estar pronta para me aconselhar durante a minha trajetória.

À Professora Márcia Helena, por todo carinho e por todos os ensinamentos que me ofereceu durante essa longa jornada.

À Marilene que teve um papel de destaque em minha formação, pois estava sempre disposta a me ajudar com meus experimentos, com a minha dissertação, além de estar sempre preocupada com o meu bem-estar.

À todos os amigos do Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental Alessandra, Antônio, Carol, Bruna, Jéssyca, Karla e Marina muito obrigado por fazerem essa caminhada mais leve, e quanto me ensinaram durante a nossa convivência, além de me proporcionar momentos divertidos.

À Professora Tania Marcourakis e ao Professor Raphael Garcia pelas valiosas contribuições, tanto nos experimentos quanto na escrita o que tornou meu trabalho mais rico.

Ao Professor Alexandre Giusti-Paiva e ao Professor Giovane Galdino de Souza por permitiram a utilização de seus equipamentos para o desenvolvimento de parte deste projeto.

À Professora Fernanda Borges de Araújo Paula por permite a utilização dos equipamentos do Laboratório de Bioquímica Clínica, além de sua atuação excepcional frente a coordenação do Programa de Pós -Graduação em Ciências Farmacêutica juntamente com o Professor Diogo Teixeira e a secretária Fabiana

À Universidade Federal de Alfenas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica por me fornecerem uma base sólida de conhecimento, permitindo, pudesse dar início a minha carreira de pesquisador juntamente com toda a infraestrutura para realização desse sonho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro para realização deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À todos aqueles que aqui não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para que este projeto fosse concretizado, meu muito obrigada.

Desde pequeno falam que eu sou curioso  
Quem me viu quem me vê  
Fala que eu nunca cresci  
Não tenho medo de errar  
Só medo de desistir

**Lagum – Ninguém me ensinou**

## RESUMO

O tabagismo é um problema de saúde pública, que acomete 25% das mulheres grávidas. Estudos prévios mostram que a exposição a fumaça de cigarro durante o início do período pós-natal interfere em processos relacionados ao desenvolvimento encefálico. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição à nicotina isolada durante o início do período pós-natal tem efeito na sensibilização comportamental à nicotina durante a idade adulta. Para isso, camundongos *Swiss* machos foram expostos à nicotina no período pós-natal por meio de minibombas osmóticas implantadas nas mães (8 mg/kg/dia). Na idade adulta, os animais foram tratados com nicotina (1 mg/kg, i. p.) ou salina durante sete dias alternados (D1, D3, D5, D7, D9 e D13) para a aquisição da sensibilização. Após três dias em abstinência, foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado, para avaliar a ansiedade. Em D18 os camundongos foram desafiados com salina ou nicotina, logo em seguida foram colocados no campo aberto para avaliação da atividade locomotora. Após os ensaios comportamentais, os animais foram eutanasiados, as estruturas encefálicas coletadas para quantificação das proteínas c-Fos, Sinapsina I e PSD-95 por meio de *Western blot*. Os resultados mostraram que houve uma diminuição da atividade locomotora nos animais que receberam nicotina em D1 quando comparados aos que receberam salina. Os animais dos grupos SAL pós-natal NIC/NIC apresentaram aumento atividade locomotora entre D1 e D13, enquanto os animais do grupo NIC pós-natal NIC/NIC apresentaram aumento atividade locomotora entre D1 e D13 e entre D1 e o dia do desafio. No teste do labirinto em cruz elevada, os animais do grupo NIC pós-natal NIC/NIC apresentaram aumento no tempo de permanência e no número de entradas nos braços abertos em relação aos animais do grupo SAL pós-natal NIC/NIC, além de diminuição no *rearing* em relação aos animais que receberam salina na fase adulta. Os resultados mostram que houve diminuição na concentração de c-Fos no cerebelo e estriado nos grupos NIC pós-natal SAL/SAL, SAL pós-natal NIC/NIC e NIC pós-natal NIC/NIC quando comparados ao grupo SAL pós-natal SAL/SAL e não houve diferença significativa nas concentrações das proteínas PSD-95 e Sinapsina. Desse modo, os resultados sugerem que a dose de nicotina utilizada durante a fase adulta não foi capaz de induzir sensibilização comportamental, embora a exposição à nicotina no início do período pós-natal tenha contribuído para o aumento da atividade locomotora no dia do desafio e para a diminuição da ansiedade durante o período de retirada da substância. Ainda, a exposição à nicotina, tanto no início do período pós-natal quanto na fase adulta, foi capaz de induzir diminuição de c-Fos no cerebelo e no estriado.

**Palavras chaves:** Tabagismo, Redução de Danos, Nicotina, Sensibilização Comportamental.

## ABSTRACT

Smoking is a public health problem which affects 25% of pregnant women. Previous studies show that the exposure to tobacco smoke during the early postnatal period interferes with processes related to the brain development. Thus, the aim of this study was to assess whether the exposure to nicotine during the early postnatal period has an effect on the behavioural sensitization to nicotine during adulthood. For this reason, male Swiss mice were exposed to nicotine between the postnatal day (PN 4) and (PN 17) by osmotic mini pumps implanted in the mothers (8 mg/kg/day). In the adulthood, the mice were treated with nicotine (1 mg/kg, i.p.) or saline solution for seven alternate days (D1, D3, D5, D7, D9 e D13) to acquire sensitization. On the third day of abstinence, the elevated plus-maze test was performed to evaluate anxiety. In D18 the mice were challenged with saline or nicotine. After the behavioural tests, the animals were euthanized and the c-Fos, Synapsin I and PSD-95 proteins were quantified by Western blot in different brain structures. There was a decrease in locomotor activity in animals that received nicotine in D1 when compared to those that received saline. The animals in the SAL postnatal NIC/NIC groups showed an increased locomotor activity between D1 and D13, while the animals in the NIC postnatal NIC/NIC group showed an increased locomotor activity between D1 and D13 and between D1 and the day of the challenge. In the elevated plus maze test, animals in the NIC postnatal NIC/NIC group showed an increase in the time and in the number of open arms entries compared to animals in the SAL postnatal NIC/NIC group in addition to a decrease in rearing compared to animals that received saline in adulthood. The results show that there was a decrease in the c-Fos levels in the cerebellum and striatum in the NIC postnatal SAL/SAL, SAL postnatal NIC/NIC, and NIC postnatal NIC/NIC when compared with SAL postnatal SAL/SAL. The results show that the dose of nicotine used during adulthood was not able to induce a behavioural sensitization although the exposure to nicotine in the early postnatal period contributed to the increase in the locomotor activity on the day of the challenge and to the decrease in anxiety during the withdrawal period. The exposure to nicotine, both in the early postnatal period and in adulthood, was able to induce a decrease in c-Fos in the cerebellum and striatum.

Keywords : Smoking, Harm Reduction, Nicotine, Behavioural sensitization.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho Experimental.....	30
Figura 2 - Padronização da proteína c-Fos .....	33
Figura 3 - Atividade locomotora dos animais de diferentes grupos experimentais em D1, D13 e DESAFIO .....	36
Figura 4 - Distância total percorrida em campo aberto ao longo da habituação e durante o processo de sensibilização .....	38
Figura 5 - Comparação da distância total percorrida em campo aberto entre os dias D1, D13 e Desafio .....	40
Figura 6 - Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos, número de entradas e rearing .....	42
Figura 7 - Quantificação da proteína c-FOS .....	44
Figura 8 - Quantificação da proteína PSD-95 .....	45
Figura 9 - Quantificação da proteína Sinapsina I .....	46

## LISTA DE ABREVIações

ANOVA	Análise de Variância
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CAM	Molécula de Adesão
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CID	Classificação Internacional de Doenças
CO	Monóxido de Carbono
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EPM	Erro Padrão Médio
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
pH	Potencial Hidrogeniônico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
I.P	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NIC	Nicotina
PMSF	Fluoreto de fenil-metano-sulfonil
PN	Pós-Natal
PNCT	Programa Nacional de Controle do Tabagismo
PSD-95	<i>Postsynaptic density -95</i>
SAL	Salina
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TBS-t	Tampão Tris-Salina com Tween 20
TRN	Terapia de Reposição a Nicotina
VIGITEL	Vigilância de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TÉORICO</b> .....	17
2.1	EPIDEMIOLOGIA .....	17
2.2	TABACO E GESTAÇÃO/LACTAÇÃO.....	18
2.3	FORMAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	20
2.4	INFLUÊNCIA DA NICOTINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	23
2.5	SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL .....	24
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	26
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
4.1	OBJETIVOS GERAIS .....	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
5.1	ANIMAIS .....	28
5.2	DESENHO EXPERIMENTAL .....	29
5.3	NICOTINA .....	30
5.4	ANÁLISE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO CAMPO ABERTO .....	31
5.5	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	31
5.6	WESTERN BLOT .....	31
5.7	PADRONIZAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C-FOS .....	32
<b>6</b>	<b>ANALISES ESTATÍSTICA</b> .....	34
<b>7</b>	<b>RESULTADO</b> .....	35
7.1	SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL .....	35
7.2	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO .....	41
7.3	WESTERN BLOT.....	43
7.3.1	<b>Quantificação das proteínas c-FOS, PSD-95 e Sinapsina I</b> .....	43
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	47
<b>9</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	51
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
	<b>ANEXOS</b> .....	68



## 1 INTRODUÇÃO

Existem mais de 6.000 substâncias na composição da fumaça do cigarro, sendo a nicotina, a principal substância psicoativa presente. Estudos demonstram que a tanto a nicotina isolada, como a exposição a fumaça do cigarro são capazes de causar diversas condições patológicas como o câncer de pulmão, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e problemas na fertilidade, especialmente na gametogênese e implantação (ROWELL *et al.*, 2015; LUBIN *et al.*, 2016). Estudos pré-clínicos mostram que essas substâncias interferem no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (DWYER *et al.*, 2009; TORRES *et al.*, 2015; TORRES *et al.*, 2019). A exposição à fumaça do cigarro no início do desenvolvimento encefálico acarreta estresse oxidativo, além de diminuir a concentração de proteínas sinápticas em diferentes estruturas encefálicas e causar prejuízo no processo de aprendizado e memória (TORRES *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2019). Em roedores, a exposição à nicotina durante o período de desenvolvimento encefálico está associada a alterações no estriado, com aumento da expressão de receptores nicotínicos e prejuízo no processo de mielinização (BRITTON *et al.*, 2007; DWYER *et al.*, 2009; BALSEVICH *et al.*, 2014).

Estudos em humanos mostram que a exposição à fumaça do cigarro durante a lactação leva a doença respiratória infantil, transtorno de déficit de atenção e síndrome da morte súbita infantil. Assim, estratégias de redução de danos, como a terapia de reposição de nicotina (TRN), têm sido consideradas. Contudo, ainda são necessários mais estudos na área para que haja melhor nível de evidência dos efeitos da nicotina durante a lactação. Estudos clínicos sobre os efeitos da TRN na lactação são escassos devido à dificuldade de sua execução, evidenciando a importância de estudos pré-clínicos na área (KREYBERG *et al.*, 2019).

Nesse contexto, o presente estudo possui como objetivo avaliar os efeitos da exposição à nicotina durante o início do período pós-natal na sensibilização comportamental em camundongos machos durante a fase adulta, além de avaliar os efeitos moleculares da nicotina em diferentes estruturas encefálicas. Para tanto, camundongos machos que receberam nicotina pela lactação durante o período pós-natal foram submetidos ao protocolo de sensibilização comportamental pela nicotina na fase adulta. Nossa hipótese é de que a exposição prévia a nicotina em um período

crítico de desenvolvimento do SNC contribui para a sensibilização comportamental pela nicotina na fase adulta.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA

A descoberta do tabaco ocorreu durante a colonização da América no século XVII, tendo rápida propagação na sociedade europeia, sendo associado a *status* social. Durante o século XIX, o tabaco surge na forma de cigarro, com ampla expansão mundial durante as duas grandes guerras (ROSEMBERG, 2004). Com o decorrer dos anos, o tabagismo tornou-se um problema de saúde pública, reconhecido como uma doença crônica, devido a dependência causada pela nicotina, principal substância presente no composto. Com isso, o tabagismo foi inserido na Classificação Internacional de Doenças (CID-10) da *World Health Organization* (WHO) e os governos de diversos países vêm desenvolvendo políticas públicas com foco na diminuição do número de fumantes. No Brasil essa campanha teve início em 1989, com a criação do Programa Nacional de Controle do Tabagismo (PNCT) (SILVA *et al.*, 2014; PORTES *et al.*, 2018).

Segundo a WHO, há cerca de 1 bilhão de tabagistas ao redor do mundo, sendo que, o tabaco é consumido em diversas formas, além do cigarro (WHO, 2014). Estima-se que 6 milhões de usuários de tabaco são levados ao óbito ao longo de cada ano, sendo que para o ano de 2030 há uma previsão da ocorrência de 8 milhões de morte relacionada ao tabagismo, com maior incidência em países de baixa e média renda (ÖBERG *et al.*, 2011; *U.S. National Cancer Institute and World Health Organization*; 2016; WHO, 2015).

O tabagismo acarreta altos custos para os sistemas de saúde. Estudos apontam que em 2012 os gastos relacionados ao tabagismo foram correspondentes a 1,8% do PIB mundial, sendo que, as doenças causadas pelo tabagismo representam 5,7% dos gastos relacionados com a saúde global (GOODCHILD *et al.*, 2017;). No Brasil o custo do tabagismo para o Sistema Único de Saúde (SUS) é de R\$ 23.374.477.024 por ano. No ano de 2011, destaca-se que o maior montante foi destinado para as doenças cardíacas (R\$ 7.219.651.548), seguido por DPOC (R\$ 6.773.192.770), câncer de pulmão (R\$ 1.596.815.061) e acidente vascular cerebral (AVC) (R\$ 1.557.995.266 (PINTO *et al.*, 2015).

Além da exposição direta a fumaça do cigarro, também ocorre exposição ambiental à esta fumaça (fumo involuntário ou passivo). De acordo com a WHO, o tabagismo passivo é definido como a inalação da fumaça de derivados do tabaco por indivíduos não-fumantes em ambientes fechados e à poluição decorrente dessa fumaça (INCA, 2008). Estudos demonstram que, no mundo, 33% dos homens, 35% das mulheres e 30% das crianças são expostos ao fumo passivo (ÖBERG *et al.*, 2011). No Brasil, 10,7% da população é exposta ao fumo passivo no ambiente domiciliar, enquanto, 13,5% é exposta em ambiente laboral (VIGITEL, 2017; WHO, 2018).

## 2.2 TABACO E GESTAÇÃO/LACTAÇÃO

No mundo, cerca de 25% das mulheres grávidas fazem o uso do tabaco. Em 2010, nos Estados Unidos, 10,7% das mulheres grávidas faziam uso do tabaco, enquanto no Canadá, a prevalência era de 23% das mulheres gestantes. De acordo, com Pereira *et al.* (2017), a prevalência do consumo do tabaco pelas gestantes brasileiras entre 1991 a 2001, ficou entre 9% a 23%. Segundo o *User Guide to the 2013 Natality Public Use File*, publicado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), no ano de 2013, 8,5% das gestantes utilizaram cigarro durante a gestação, sendo 8,3% no primeiro trimestre, 7,1% no segundo e 6,7% no último trimestre (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION *et al.*, 2013). Domingues *et al.* (2019) demonstraram a prevalência do tabagismo em mulheres no período pré-gestacional e gestantes no Brasil. Os resultados encontrados pelos pesquisadores foi de que 16,1% fizeram uso do tabagismo durante o período pré-gestacional, 9,6% relataram o tabagismo durante algum momento da gravidez e 6,8% utilizaram cigarro durante toda a gestação, indicando, desse modo, uma alta prevalência do tabagismo durante a gravidez.

O tabagismo durante a gravidez é considerado um problema de saúde pública (MARITZ, 1995; LAMBERS *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 2015). Isso decorre principalmente da passagem de metabólitos pela barreira placentária, como a nicotina e o monóxido de carbono (VIGGIANO *et al.* 1990). A nicotina interfere na função dos neurotransmissores, afetando os vasos placentários e hematoencefálico, o que contribui para vasoconstrição e alteração da frequência cardíaca do feto (MELLO *et*

*al.*, 2001; HOLBROOK, 2016). Por outro lado, a combinação do monóxido de carbono com a hemoglobina materna e/ou fetal pode gerar hipóxia, sendo que mães fumantes também podem apresentar aumento de lactato em sua circulação (VIGGIANO *et al.*, 1990; MELLO *et al.*, 2001).

Vale ressaltar que quando a puérpera é tabagista ocorre a transferência da nicotina para a criança por meio da amamentação, sendo que a concentração de nicotina no leite é três vezes maior do que no plasma (STELDINGER *et al.*, 1988). De acordo com o estudo Calvaresi *et al.* (2016) a concentração de nicotina no organismo materno tem pico máximo após meia hora da exposição. A cotinina, por sua vez, é um dos principais metabólitos da nicotina encontrado no leite materno, e permanece no organismo após 12 horas de exposição, mesmo que haja abstinência.

A utilização do tabaco durante a gravidez, pode levar a danos como baixo peso ao nascer; maiores chances de ocorrer abortos espontâneos; defeitos cardíacos congênitos e diminuição da produção de leite (MELLO *et al.*, 2001; MUND *et al.*, 2013). Galão *et al.* (2009) em seu estudo com 718 puérperas, em que 23% se declararam fumantes ativas durante toda a gestação, demonstraram a diminuição do peso dos recém-nascidos em relação às mães não-fumantes. A exposição à fumaça do cigarro durante a lactação é associada a distúrbios como transtorno de déficit de atenção e síndrome da morte súbita infantil (EINARSON e RIORDAN, 2009). Ainda assim, estudos sugerem que a amamentação deve ser mantida e estimulada em mulheres fumantes, já que a amamentação prolongada está relacionada a menores índices de morbidade e mortalidade nas crianças (DOREA, 2007). As mulheres fumantes não amamentam ou interrompem precocemente a amamentação, contudo, as crianças continuam sendo expostas ao fumo passivo.

Neste contexto, estratégias de redução de danos, incluindo o tratamento da dependência pelo tabaco, têm sido consideradas. Além da terapia psicológica e grupos de apoio, são utilizados antidepressivos, vareniclina e terapia de reposição de nicotina (TRN), com gomas de mascar ou adesivos transdérmico contendo nicotina (BARAONA *et al.*, 2017). No Brasil estão disponíveis gomas de mascar com 2 mg nicotina/unidade e adesivos transdérmico com 7 mg, 14 ou 21 mg nicotina/unidade, com a indicação de utilização por 24 horas (FOCCHI *et al.*, 2005).

Em estudo conduzido por Bérard *et al.* (2016), apresentaram uma resposta mais promissoras quando a administração da TRN foi realizada em associação com

o antidepressivo bupropiona, verificando diminuição do tabagismo durante a gestação. Contudo, em mulheres gestantes e lactantes, o uso da TRN é preferível já que a efetividade e os perfis de segurança e riscos dos antidepressivos e da vareniclina ainda não estão claros. Além disso, apesar da grande quantidade de estudos pré-clínicos com foco nos efeitos deletérios da nicotina, ainda não há consenso. Pesquisadores discutem que os efeitos observados em roedores não são reproduzidos em humanos devido à dose de nicotina utilizada nos ensaios em animais, que seriam mais elevadas do que as observadas em mulheres fumantes ou em uso de TRN (DOREA, 2007). De fato, a TRN é considerada como compatível com a amamentação pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010) e como risco muito baixo na amamentação pela Associação para Promoção e Pesquisa Cultural e Científica sobre Aleitamento Materno, uma das principais associações na área (APILAM, *Association for Promotion of and cultural and scientific Research into Breastfeeding*; <http://e-lactancia.org>). Além disso, com a justificativa de falta de evidências científicas, a Academia Americana de Pediatria não inclui a nicotina na lista de drogas contraindicadas durante a lactação (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2001).

Além de tais estratégias, estudos mostram que há aumento do uso de cigarro eletrônico na população em geral e também por mulheres, devido à sensação de ser menos prejudicial do que o cigarro tradicional. Mcmillen *et al.* (2014) compararam a prevalência do uso do cigarro eletrônico entre fumantes durante o período de 2010 a 2013. No ano de 2010 apenas 6,2% dos fumantes responderam que fizeram uso de cigarro eletrônico pelo menos uma vez, já no ano de 2013 esse número aumentou para 54,2%. Nesse mesmo estudo é possível observar a prevalência do uso de cigarro eletrônico em homens e mulheres fumantes. No ano de 2010, 2,2% dos homens e 1,4% das mulheres fumantes fizeram uso do cigarro eletrônico. Já em 2013, 13,9% dos homens e 12,4% das mulheres fumantes fizeram uso do cigarro eletrônico. Cavalcante *et al.* (2017) avaliaram 727 indivíduos fumantes acima de 18 anos no Brasil, o estudo mostrou que 37,4% dessa população têm conhecimento do cigarro eletrônico, 9,3% já fizeram o uso desse dispositivo e 4,6% fizeram uso nos últimos seis meses.

### **2.3 FORMAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

A formação do SNC é um processo complexo que se inicia durante o desenvolvimento intrauterino em humanos, e se estende principalmente durante os primeiros anos de vida pós-natal. Durante o período da gestação há o processo de neurulação, que consiste na formação da placa neural por meio do espessamento do ectoderma, conduzindo o desenvolvimento da notocorda (LAHUNTA *et al.*, 2016). Após a formação do sulco neural propriamente dito, ocorre em conjunto com as dobras neurais, o surgimento do tubo neural. O tubo neural se desenvolverá à medida que o SNC é formado e ao final de processo verifica-se a presença do neuroporo rostral (SILBEREIS *et al.*, 2016), que ao se desenvolver levará a formação de três vesículas que darão origem ao prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, bem como a medula espinal na parte caudal (LAHUNTA *et al.*, 2016).

Em roedores, o período gestacional ocorre em 22 dias, período equivalente aos dois primeiros trimestres gestacionais em humanos. O desenvolvimento do SNC em roedores também tem início durante o período gestacional, no entanto, parte considerável deste processo ocorre durante o período pós-natal. Nestes animais, o início do desenvolvimento do SNC se inicia em torno do 11º dia gestacional, com o desenvolvimento do neuroepitélio, composto de células proliferativas que geram os neurônios e células da glia, sendo que a parte rostral será responsável pelo desenvolvimento do prosencéfalo. Em conjunto, a porção caudal do tubo neural será responsável pelo desenvolvimento da ponte e da medula espinal. Após a ramificação dos neurônios, há início das conexões sinápticas e da transmissão química (DWYER *et al.*, 2009).

Com relação ao desenvolvimento do SNC, as duas primeiras semanas do período pós-natal dos roedores é análoga ao terceiro trimestre da gestação em humanos. Nesse período, há crescimento encefálico, arborização dendrítica, crescimento axonal, mielinização e picos dos processos de sinaptogênese, glicogênese e maturação da neurotransmissão (BAYERYER *et al.*, 1993; QUINN *et al.*, 2005; DWYER *et al.*, 2008, 2009).

Nos humanos, o desenvolvimento do SNC tem início no período embrionário e estende-se até a adolescência, com a ocorrência de vários processos, como é o caso da sinaptogênese e da mielinização. Com o início da vida adulta, existe a contínua recapitulação da sinaptogênese, que é estimulada pela plasticidade sináptica

e está relacionada aos estímulos ambientais, promovendo o remodelamento sináptico durante a vida adulta (RICE *et al.*, 2000; MOURA-RIBEIRO *et al.*, 2006).

Durante o amadurecimento do SNC, ocorrem simultaneamente diversos processos, destacando-se a sinaptogênese, caracterizada por alterações bioquímicas e morfológicas entre os elementos pré e/ou pós-sinápticos (RICE *et al.*, 2000). A formação das sinapses tem início com o desenvolvimento dos axônios e dendritos, por meio da diferenciação celular. Em seguida ocorre o processo de ramificação celular, em que moléculas são secretadas para guiar os axônios aos seus alvos e também para promover a sua maturação. O reconhecimento do local correto pelos axônios é feito por moléculas de adesão (CAM), levando a formação de uma zona pré-sináptica e com isso a estabilização da sinapse (WAITES *et al.*, 2005; SÜDHOF, 2018).

Ao longo do desenvolvimento do SNC existem proteínas cuja a sua síntese está relacionada a atividade neuronal, como é o caso da c-Fos, sinapsina I e PSD-95. (GALLO *et al.*, 2018). A síntese da c-Fos está relacionada a estímulos elétricos ou químicos, que ocorrem pela ação de neurotransmissores como glutamato ou da norepinefrina. A ativação dessa enzima pode ocorrer por meio do aumento de AMP cíclico ou pela indução direta devido ao influxo de cálcio (GALLO *et al.*, 2018; KOVÁCS, 1998). O aumento da concentração de c-Fos pode ser observado nos tecidos até 180 minutos após seu estímulo (FARIVAR *et al.*, 2004; GALLO *et al.*, 2018; JAWORSKI *et al.*, 2018).

A proteína sináptica sinapsina I está envolvida na regulação da sinaptogênese, atuando no alongamento de axônios e na regulação das vesículas sinápticas durante a liberação dos neurotransmissores, auxiliando a ancoragem das mesmas (FERREIRA *et al.* 1998; MIRZA *et al.*, 2017). A ação da sinapsina I envolve sua ligação com a actina do citoesqueleto celular. Quando a sinapsina é fosforilada há liberação das vesículas sinápticas, que serão incorporadas à membrana plasmática, permitindo a liberação dos neurotransmissores (HOSAKA *et al.*, 1999; THIEL, 1993). A PSD-95 (*postsynaptic density - 95*) compreende proteínas de membrana pós-sináptica localizadas nos espinhos dendríticos de sinapses excitatórias (CHENG *et al.*, 2006; COLEY *et al.*, 2018). Essas proteínas possuem funções relacionadas à maturação de sinapses excitatórias e na transdução dos sinais pós-sinápticos (KIM *et al.*, 2004; DOUCET *et al.*, 2012).



## 2.4 INFLUÊNCIA DA NICOTINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A nicotina presente no cigarro é capaz de ultrapassar a barreira placentária e chegar ao feto, causando efeitos em seu organismo (MOHAMMADI *et al.*, 2017). Durante o período pós-natal a exposição à nicotina pode ocorrer por meio da ingestão no leite materno e pelo fumo passivo (CALVARESI *et al.*, 2016). Estudos clínicos mostram que a exposição à nicotina durante o período gestacional está associada à déficit de atenção, e prejuízo da memória e ao aprendizado (WICKSTROM, 2007; HAWKEY *et al.*, 2019). O tabagismo materno também provoca diminuição nos escores motores e na compreensão verbal, além de afetar processos sensoriais e auditivos (GUSELLA *et al.*, 1984; ERNST *et al.*, 2001).

Estudos pré-clínicos mostram que a exposição à nicotina durante o período gestacional pode levar a dessensibilização dos receptores nicotínicos do tipo  $\alpha 4$ , os quais estão presentes no SNC durante a gestação, interferindo no desenvolvimento da atividade sináptica. A utilização de nicotina também está relacionada à indução de apoptose pela desregulação endócrina precoce e pela redução do metabolismo de neurotransmissores, como dopamina e serotonina (NAVARRO *et al.*, 1989; LAW *et al.*, 2003; LV *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 2010;).

Estudos demonstram que a exposição a nicotina durante o período pós-natal leva a diminuição de proteínas pré e pós-sinápticas envolvidas no sistema glutamatérgico, além de alterar comportamentos relacionados a ansiedade e depressão. Além disso, a exposição combinada de nicotina durante o período pré-natal e de álcool durante a fase adulta é capaz de causar alterações nas espécies reativas de oxigênio, além de provocar aumento em proteínas relacionadas a apoptose como caspase-3, além de diminuir proteínas relacionadas a função sináptica, como a PSD-95 (PARAMESHWARAN *et al.*, 2011; BHATTACHARYA *et al.*, 2020).

A exposição a nicotina pode alterar a concentração de c-Fos em determinadas áreas do encéfalo. Hsu *et al.* (2007) analisaram os efeitos da nicotina frente ao estresse por restrição e a ansiedade, demonstrando redução na concentração de c-Fos no núcleo central, núcleo medial da amígdala e núcleo paraventricular hipotalâmico. A administração aguda de nicotina alterou a concentração de c-Fos em

áreas corticais e estriatais. Ainda, a exposição a nicotina ao longo do período pré-natal provocou a diminuição da expressão de c-Fos em áreas corticais, porém houve o aumento de sua expressão em regiões estriatais, assim como em áreas relacionadas a visão durante a adolescência (MATHIEU-KIA *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2006).

A exposição à nicotina por via intraperitoneal durante a adolescência de roedores leva a efeitos agudos, como aumento da concentração de serotonina, e a efeitos crônicos, como diminuição da atividade da enzima colina acetiltransferase. A administração de nicotina durante a adolescência também está relacionada a alteração na conectividade sináptica e processamento da informação, uma vez que o uso da nicotina pode promover remodelamento estrutural dos dendritos, levando a alteração no padrão de sinaptogênese. Vale destacar que a administração de nicotina durante a adolescência aumenta a chance de desenvolver a dependência na fase adulta (SLOTKIN *et al.*, 2007; SHEARMAN *et al.*, 2008; DWYER; *et al.*, 2009; BRACKEN *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2015).

## 2.5 SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL

A farmacodependência é descrita na literatura como um distúrbio crônico e complexo, sendo caracterizado pela busca compulsiva e repetida por substâncias psicoativas. A compulsão é duradoura e pode retornar inesperadamente após um período de melhora. Esse transtorno está associado ao desenvolvimento emocional do indivíduo, mas também apresenta fatores ambientais e sociais. O Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DMS-5) preconiza a utilização do termo transtornos relacionados às substâncias, que consiste em um conjunto de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos relacionados ao uso abusivo de substâncias, em que há adaptação do organismo, recidiva de um ciclo caracterizado pela procura da droga, intoxicação e a abstinência (SANNA *et al.*, 1998; GOLDSTEIN *et al.*, 2002; NESTLER, 2004; ZILVERSTAND *et al.*, 2018).

O desenvolvimento do processo de sensibilização ocorre através de exposições repetidas a uma substância psicoestimulante, por meio da ativação da via mesolímbica, principalmente na área tegumental ventral e do *núcleo accumbens* (PIERCE *et al.*, 1997; VEZINA *et al.*, 2007; STEKETEE *et al.*, 2011). A exposição repetida de substâncias relacionadas ao abuso, resulta em reforço positivo e aumento

gradual e progressivo na atividade locomotora em roedores, processo este, denominado sensibilização comportamental (POST *et al.*, 1983; ROBINSON *et al.*, 1986; ANDERSON *et al.*, 2005). O desenvolvimento da sensibilização comportamental resulta em adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico mesolímbico (ROBINSON *et al.*, 1986; NESTLER *et al.*, 2001). Contudo, o processo de sensibilização não resultaria no aumento do efeito reforçador das drogas, mas da saliência motivacional do estímulo (ROBINSON *et al.*, 2003).

O papel da dopamina está relacionado com a mediação da sensação subjetiva do prazer, e regulação do impulso motivacional, incluindo os estímulos reforçadores. Durante o processo de sensibilização ocorreria estímulos (uso da droga e comportamentos relacionados) altamente salientes, atrativos e desejados. Em suma, resultaria em aumento patológico da relevância que o SNC atribui ao ato de consumir a droga. Assim, com o uso repetido, a droga e os estímulos associados tornam-se progressivamente mais atrativos e capazes de controlar o comportamento. Dessa forma, desenvolve-se a fissura pela droga e seu uso compulsivo (ROBINSON *et al.*; 1993; 2001).

O modelo de sensibilização comportamental tem sido utilizado para avaliar as principais adaptações neuroquímicas desenvolvidas no SNC, em decorrência da utilização de substâncias de abuso. O desenvolvimento do processo de sensibilização é dividido em duas fases, aquisição e expressão. A fase de aquisição ocorre por meio de processos moleculares, celulares e fisiológicos temporários, promovendo neuroadaptações devido a administração repetidas de psicoestimulantes. Essas alterações ocorrem na área tegmental ventral e alteram a função neural em longo prazo (PIERCE *et al.*, 1997; ROBINSON *et al.*, 2001 CAMARIN *et al.*, 2016). A expressão é caracterizada pela reexposição a substância logo após um período de abstinência. Durante a expressão da sensibilização ocorrem mudanças duradouras na função neuronal decorrentes da fase de aquisição. As principais modificações moleculares e celulares desta fase ocorrem no *núcleo accumbens* (ROBINSON *et al.*, 2001 CAMARIN *et al.*, 2016;)

### 3 JUSTIFICATIVA

A utilização do tabaco durante a gravidez e lactação levar a danos como baixo peso ao nascer; maiores chances de ocorrer abortos espontâneos; defeitos cardíacos congênitos, diminuição da produção de leite, transtorno de déficit de atenção e síndrome da morte súbita infantil (MELLO *et al.*, 2001; EINARSON e RIORDAN, 2009 MUND *et al.*, 2013). Devido ao conhecimento comum sobre os danos da fumaça do cigarro, as mulheres fumantes são consideradas grupo de risco para não amamentar ou interromper precocemente a amamentação, pelo medo das substâncias presentes no cigarro passarem para o leite. Contudo, tais mulheres não deixam de fumar, expondo as crianças ao fumo passivo. Assim, estratégias de redução de danos do tabaco, incluindo a terapia de reposição de nicotina, têm sido consideradas. Neste contexto, novos estudos são necessários para avaliar os efeitos da nicotina isolada em uma fase crítica do desenvolvimento do SNC. Assim, o presente projeto visa investigar a relação entre a exposição à nicotina durante o início do período pós-natal de camundongos por meio do aleitamento materno na predisposição à sensibilização comportamental e mudanças de concentração de proteínas sinápticas na vida adulta.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto é avaliar se a exposição à nicotina durante o início do período pós-natal é capaz de predispor os animais à sensibilização comportamental pela nicotina na vida adulta, além de avaliar alterações moleculares induzida pela exposição à nicotina durante o período pós-natal seguida exposição à nicotina na fase adulta.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilização comportamental pela nicotina em animais adultos expostos ou não à nicotina durante início do período pós-natal.
- Avaliar a concentração das proteínas c-Fos, PSD 95 e sinapsina I, em diferentes estruturas encefálicas, por meio de *Western blot*.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

No presente projeto foram utilizados camundongos Swiss provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas e aprovado pelo comitê de ética desta Instituição (54/2018; Anexo I).

Durante a execução do projeto, os animais foram mantidos em caixas de polietileno, tendo o livre acesso à água e comida (ração para roedores Nuvilab CR1®), temperatura controlada ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de doze horas (luz ligada às 7:00 h). Todos os experimentos foram realizados no período claro.

### 5.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O protocolo envolve exposição dos animais à nicotina por meio do aleitamento materno, portanto, realizou-se o acasalamento para obtenção da prole, sendo alocados duas fêmeas para cada macho durante 5 dias. Foi obtido uma prole de cinquenta e seis machos para o desenvolvimento do projeto em questão, enquanto as fêmeas foram designadas para outro projeto em vigência no laboratório.

No quarto dia pós-natal (PN 4), as fêmeas lactantes foram submetidas a um processo cirúrgico para implantação da minibomba osmótica contendo 200  $\mu\text{L}$  da solução de nicotina (8 mg/kg/dia) ou salina 0,9% estéril (NUNES-FREITAS *et al.*, 2011; ROGUSKI *et al.*, 2014). Como medida profilática, um dia antes da cirurgia os animais receberam a aplicação de amoxicilina na dose de 22 mg/kg. Para a cirurgia, os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p.), realizando um corte sobre o dorso do animal para inserção da minibomba osmótica. Após o procedimento, as fêmeas foram colocadas na caixa para a amamentação dos filhotes até o PN16. Em PN 17, a minibomba foi retirada cirurgicamente seguindo o mesmo procedimento cirúrgico exposto anteriormente.

Durante a fase de lactação cada fêmea ficou responsável por oito filhotes, sendo quatro machos e quatro fêmeas. Quando os animais chegaram na fase adulta, em PN 65, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

➤ **GRUPO SAL pós-natal SAL /SAL (n=14)** – animais que receberam salina durante o período pós-natal e que receberam salina durante o protocolo de sensibilização comportamental na fase adulta (aquisição e desafio).

➤ **GRUPO SAL pós-natal NIC/NIC (n=14)** – animais receberam salina durante o período pós-natal e que receberam nicotina durante o protocolo de sensibilização comportamental na fase adulta (aquisição e desafio).

➤ **GRUPO NIC pós-natal SAL/SAL (n=14)** – os animais receberam nicotina durante o período pós-natal e que receberam salina durante o protocolo de sensibilização comportamental na fase adulta (aquisição e desafio).

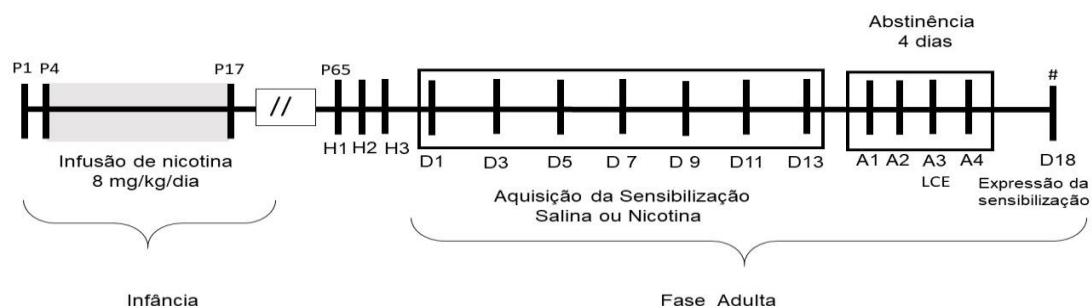
➤ **GRUPO NIC pós-natal NIC/NIC (n=14)** – os animais receberam nicotina durante o período pós-natal e que receberam nicotina durante o protocolo de sensibilização comportamental na fase adulta (aquisição e desafio).

O protocolo de sensibilização comportamental foi iniciado por meio da análise da atividade locomotora dos animais em campo aberto. Nos três primeiros dias do experimento, os animais foram expostos durante 30 minutos ao campo aberto. Este procedimento permitiu a habituação dos animais ao aparelho comportamental. No quarto dia, os animais receberam uma injeção de salina ou nicotina (i.p), na dose de 1,0 mg/kg (CELIK *et al.*, 2006), e foram colocados imediatamente no campo aberto. A atividade locomotora foi avaliada durante 30 minutos. Este procedimento foi repetido sete vezes em dias alternados, conforme descrito por Ulusu *et al.* (2004).

Os animais foram submetidos a um período de quatro dias de abstinência, antes de ocorrer a expressão da sensibilização comportamental. No terceiro dia de abstinência, foi realizado ensaio em labirinto em cruz elevado por 5 minutos. No dia da expressão da sensibilização (desafio), os animais receberam uma dose de salina ou nicotina (1 mg/kg; i.p.), e logo foram colocados no campo aberto para análise da atividade locomotora durante 30 minutos.

A Figura 1 ilustra o desenho experimental.

Figura 1 - Desenho experimental do presente projeto



Fonte: do Autor

Legenda: Desenho experimental do presente projeto. As fêmeas lactantes foram submetidas à implantação da minibomba de infusão contendo nicotina (8 mg/kg/dia) ou salina 0,9% estéril no quarto dia pós-natal (PN 4), permanecendo com a bomba até PN 17. Quando os animais chegaram na fase adulta PN65, iniciou-se o protocolo de sensibilização comportamental pela nicotina. A habituação dos animais ao equipamento foi realizada durante três dias (H1 a H3) durante 30 minutos. Em D1, D3, D5, D7, D9, D11, e D13 os animais receberam uma injeção de salina ou nicotina (1,0 mg/kg). Durante os 4 dias de abstinência (A1 a A4), os animais não receberam nenhum tipo de tratamento. Após este período, foi realizada a expressão da sensibilização comportamental, em que os animais receberam uma injeção de salina ou nicotina, e foram avaliados em campo aberto durante 30 minutos. No terceiro dia de abstinência foi realizado ensaio em labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais foram eutanasiados (#) imediatamente após o ensaio da expressão da sensibilização comportamental.

Imediatamente após o término dos ensaios comportamentais, os animais foram eutanasiados com auxílio da guilhotina. Logo após a eutanásia, retirou-se as seguintes estruturas: estriado, hipocampo, cerebelo e tronco encefálico. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para os ensaios de *Western blot*.

### 5.3 NICOTINA

A nicotina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi diluída em solução salina 0,9% estéril e injetada em minibombas osmóticas modelo 2002 (ALZET®), que permitiu a liberação de  $0,50\text{ }\mu\text{l}$  por hora. Durante o período pós-natal foi utilizada a dose de 8 mg/kg/dia. Ao longo do protocolo de sensibilização comportamental por sua vez, utilizou-se a dose de 1 mg/kg.



## 5.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO CAMPO ABERTO

A atividade locomotora dos animais foi avaliada em campo aberto, que consiste em uma arena circular de madeira com 40 cm de diâmetro e 40 cm de altura. Durante o teste, os animais foram colocados no centro da área do aparato e observados durante 30 minutos. Com o término de cada observação, o campo aberto foi limpo com uma mistura de álcool-água 5% antes da introdução do próximo animal, com objetivo de evitar interferência do animal anterior pelo odor (MARTINS, 2009). Para minimizar os efeitos causados pelo ciclo circadiano, os testes foram realizados sempre em um mesmo horário, durante a parte da manhã. O registro da atividade dos animais foi realizado com uma câmera digital. Os vídeos com os animais foram analisados por meio do *software* EthoVision XT (Noldus, The Netherlands).

## 5.5 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um aparato comportamental constituído em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados de mesmo tamanho, distante 60 cm do chão. Os braços do aparato se cruzam formando um ângulo reto sendo unidos por uma área central. Os animais foram observados no LCE durante 5 minutos, sendo avaliados: a porcentagem de tempo de exploração dos braços aberto e fechados, a porcentagem do número de entradas nos braços abertos e comportamento de *rearing* (PELLOW *et al.*, 1985). O *rearing* consiste no animal ficar em pé sob as patas traseiras, sendo um comportamento relacionado à ansiedade. Quanto maior a ansiedade, maior a frequência de *rearing*. O registro da atividade dos animais foi realizado com uma câmera digital. Os vídeos com os animais foram analisados por meio do *software* EthoVision XT (Noldus, The Netherlands).

## 5.6 WESTERN BLOT

As proteínas c-Fos PSD-95 e Sinapsina I foram quantificados no tronco encefálico, cerebelo, hipocampo e no estriado por meio de *Western blot*. As amostras foram homogeneizadas com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4 contendo 1,0 mM de PMSF e coquetel inibidor de protease 1:1000 (Sigma) na diluição 1:5(g/ml) e ajustadas

para a mesma concentração proteica pelo método de Bradford. Em seguida, 130  $\mu$ L da amostra foram diluídos com 30  $\mu$ L de tampão de Laemmli.

Quantidades variáveis do extrato proteico (c-Fos: 75  $\mu$ g; PSD-95 e Sinapsina I: 25  $\mu$ g) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (c-Fos: 12,5%; PSD-95 e Sinapsina I: 10%). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana PVDF (Millipore, 0,2  $\mu$ m de diâmetro) sob amperagem constante de 0,8 A durante 120 minutos. A transferência foi confirmada pela coloração das membranas com o corante vermelho de *Ponceau* e as membranas lavadas com TBS-t (Tampão Tris-Salina com Tween 20). Após, houve o bloqueio com leite desnatado 5% em tampão TBS-t por 90 minutos a fim de saturar os sítios de ligações inespecíficas. As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos diluídos em TBS-t e em concentrações previamente padronizadas; c-Fos (Abcam ab134122 – 1:2000); PSD-95 (Abcam ab13552 – 1:1000); Sinapsina I (Abcam Ab64581 – 1:1000). Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-t e incubadas por 2 horas com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti *rabbit*, 1:5000 – Santa Cruz *Biotechnology* ou anti *mouse* 1:5000 – Santa Cruz *Biotechnology*). O excesso de conjugado foi removido com mais um ciclo de lavagens 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* LAS 500, GE *Healthcare*) e digitalizadas (*IQuantCapture* 400, v.1.0.0, GE *Healthcare*) e as intensidades das bandas imunorreativas foram comparadas pelo programa *ImageQuant* (GE *Healthcare*) e expressas em unidades arbitrárias. Utilizou-se a proteína  $\beta$ -actina (controle interno; 1:25000) como fator normalizador.

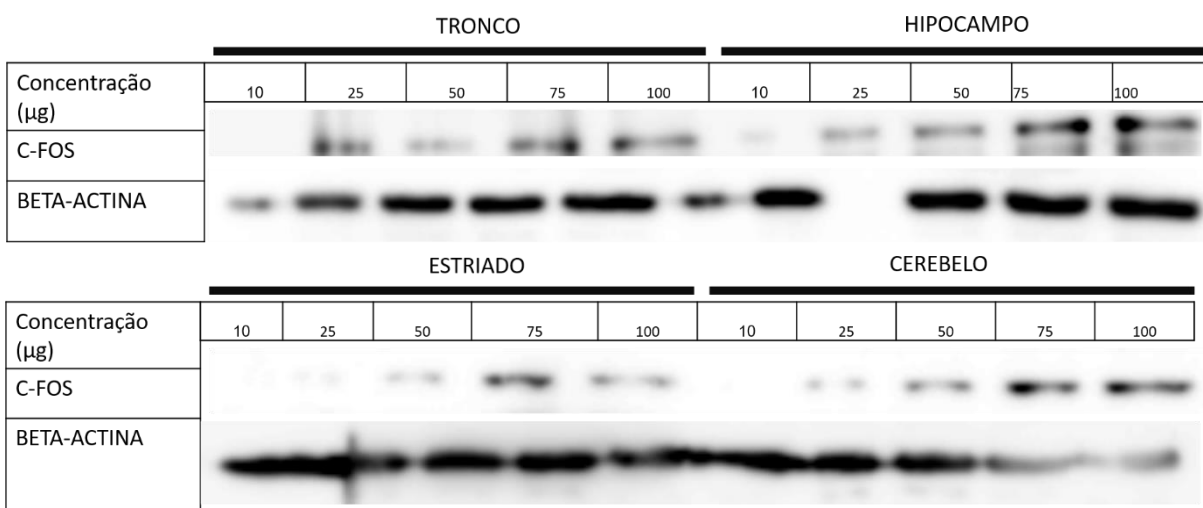
## 5.7 PADRONIZAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C-FOS

A padronização da quantificação da proteína c-Fos possibilitou a determinação da quantidade de proteína a ser utilizada no ensaio e a diluição do anticorpo primário. A diluição de anticorpo utilizada foi de 1:2000, que estava presente no intervalo especificado pelo fabricante, sendo adequada para as condições em nosso laboratório e assim, foi a diluição de escolha nas amostras do estudo. Com relação à quantidade

de proteína, a aplicação de 75 µg foi suficiente em todas as estruturas, como observado na Figura 2.

As diluições e a quantidade das proteínas PSD-95 (1:1000; 25 µg) e sinapsina I (1:1000; 25 µg). já haviam sido padronizados previamente em nosso laboratório.

Figura 2 – Padronização da proteína c-Fos por do ensaio de *Western blot*



Fonte: do Autor.

Legenda: Para quantificação de c-Fos. Foram realizadas aplicações com diferentes quantidades de proteínas totais (10, 25, 50, 75 e 100 µg) nas quatro estruturas de interesse do estudo: tronco encefálico, hipocampo, estriado e cerebelo.

## 6 ANÁLISES ESTATÍSTICA

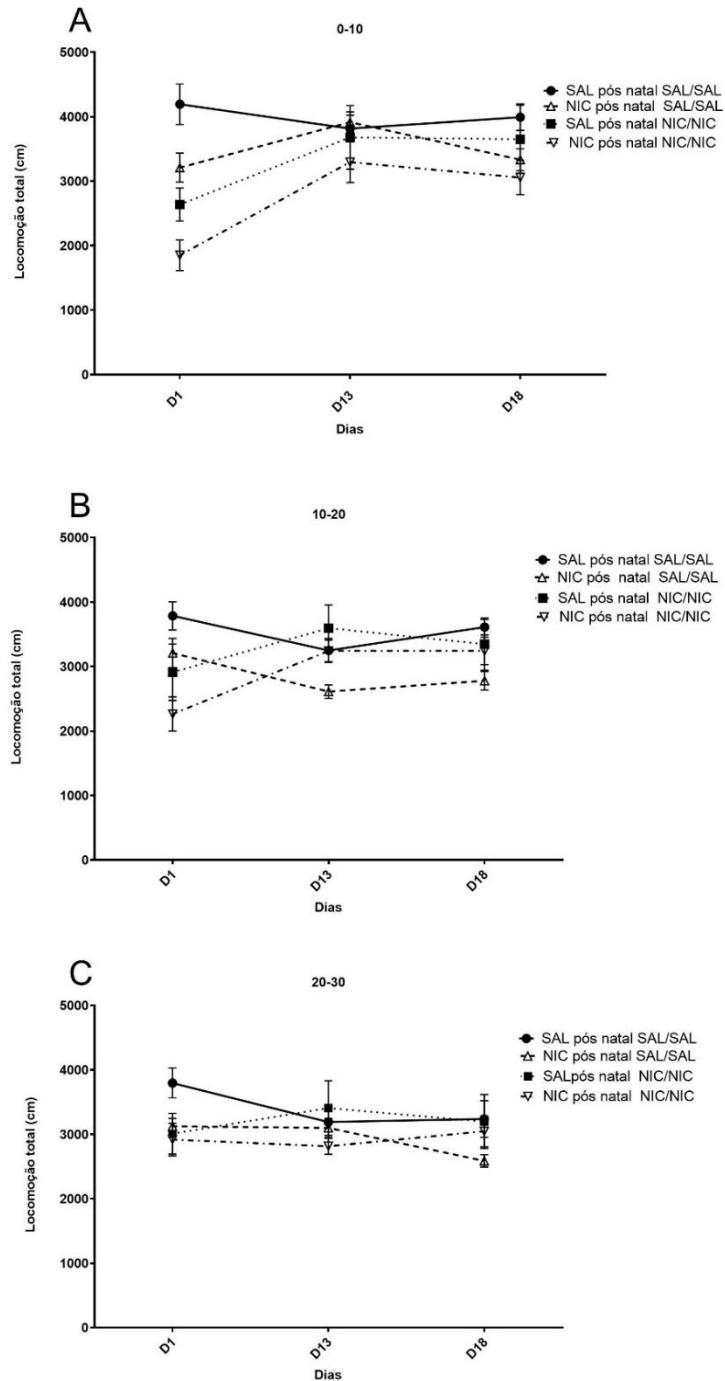
Nas análises da atividade locomotora, os grupos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas ou ANOVA duas vias, seguida do teste *post-hoc* Newman-Keuls. Nas análises de labirinto em cruz elevado os grupos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) uma via seguida do teste *post-hoc* Newman-Keuls. Nas análises de *Western blot* os grupos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) uma via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) e considerados significativamente diferentes para valores de  $p < 0,05$ .

## 7 RESULTADOS

### 7.1 SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL

Para analisar a sensibilização comportamental pela nicotina, realizou-se o registro da atividade locomotora do animal durante 30 minutos, visto que o pico de locomoção varia entre os estudos (ULUSU *et al.*, 2004; BUDZYNSKA *et al.*, 2013). A Figura 3 mostra os registros da atividade locomotora em diferentes intervalos de tempo - 0 a 10 minutos (Figura 3A), 10 a 20 minutos (Figura 3B), 20 a 30 minutos (Figura 3C). O processo de aquisição da sensibilização é avaliado entre os dias D1 e D13, enquanto a expressão da sensibilização em D18. Os resultados indicam que o intervalo entre 0 e 10 minutos representou melhor o pico de atividade locomotora e menor heterogeneidade para os animais que receberam nicotina durante o protocolo. Assim, as demais análises estatísticas para do processo de sensibilização comportamental foram realizadas com este intervalo de tempo, de 0-10 minutos.

**Figura 3:** Atividade locomotora dos animais de diferentes grupos experimentais em D1, D13 e DESAFIO (D18).

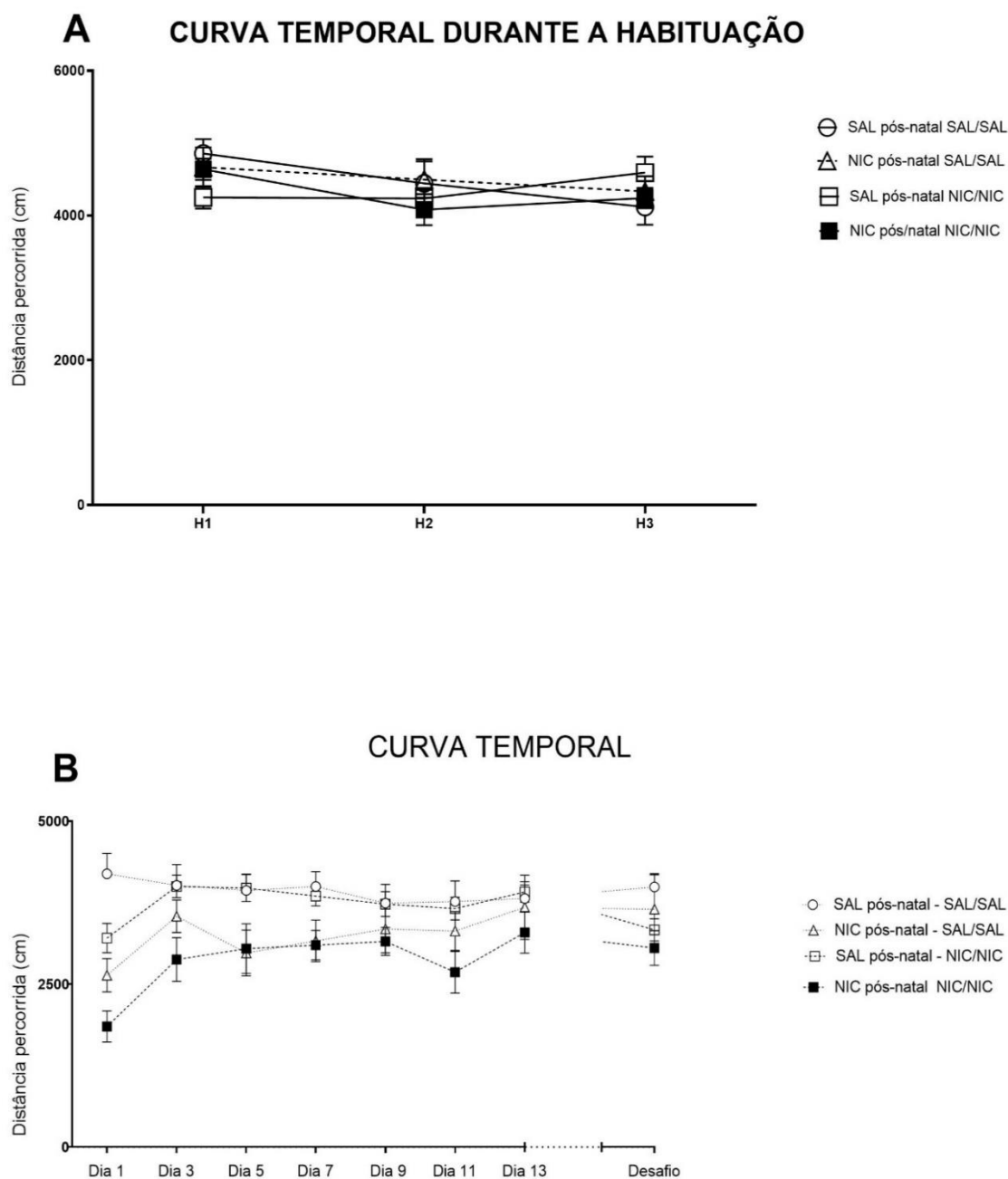


Fonte: do Autor.

Legenda : Grupos: SAL pós-natal SAL/SAL (n=14), SAL pós-natal NIC/NIC (n= 14), NIC pós-natal SAL/SAL (n= 14), NIC pós-natal NIC/NIC (n= 14). A – Intervalo de 0 a 10 minutos no campo aberto; B – Intervalo de 10 a 20 minutos no campo aberto; C – Intervalo de 20 a 30 minutos no campo aberto.

A Figura 4A mostra a locomoção dos animais durante o processo de habituação. A ANOVA para medidas repetidas, mostrou que não houve efeito significativo de tratamento ( $F_{3,52} = 0,70$ ;  $p > 0,05$ ) nem de efeito significativo de tempo ( $F_{3,52} = 1,11$ ;  $p > 0,05$ ) ou interação estatística entre tratamento e tempo ( $F = 6,52$  1,00;  $p > 0,05$ ). A Figura 4B mostra o protocolo de sensibilização comportamental. Observou-se efeito significativo de tratamento ( $F_{3,52} = 7,90$ ;  $p < 0,001$ ), e do tempo ( $F_{3,52} = 3,55$ ;  $p < 0,001$ ), bem como, interação estatística entre tratamento e tempo ( $F = 21,52 = 2,85$   $p < 0,001$ ), entre os diferentes grupos experimentais.

Figura 4 - Distância total percorrida em campo aberto ao longo da habituação e durante o processo de sensibilização



Fonte: do Autor.

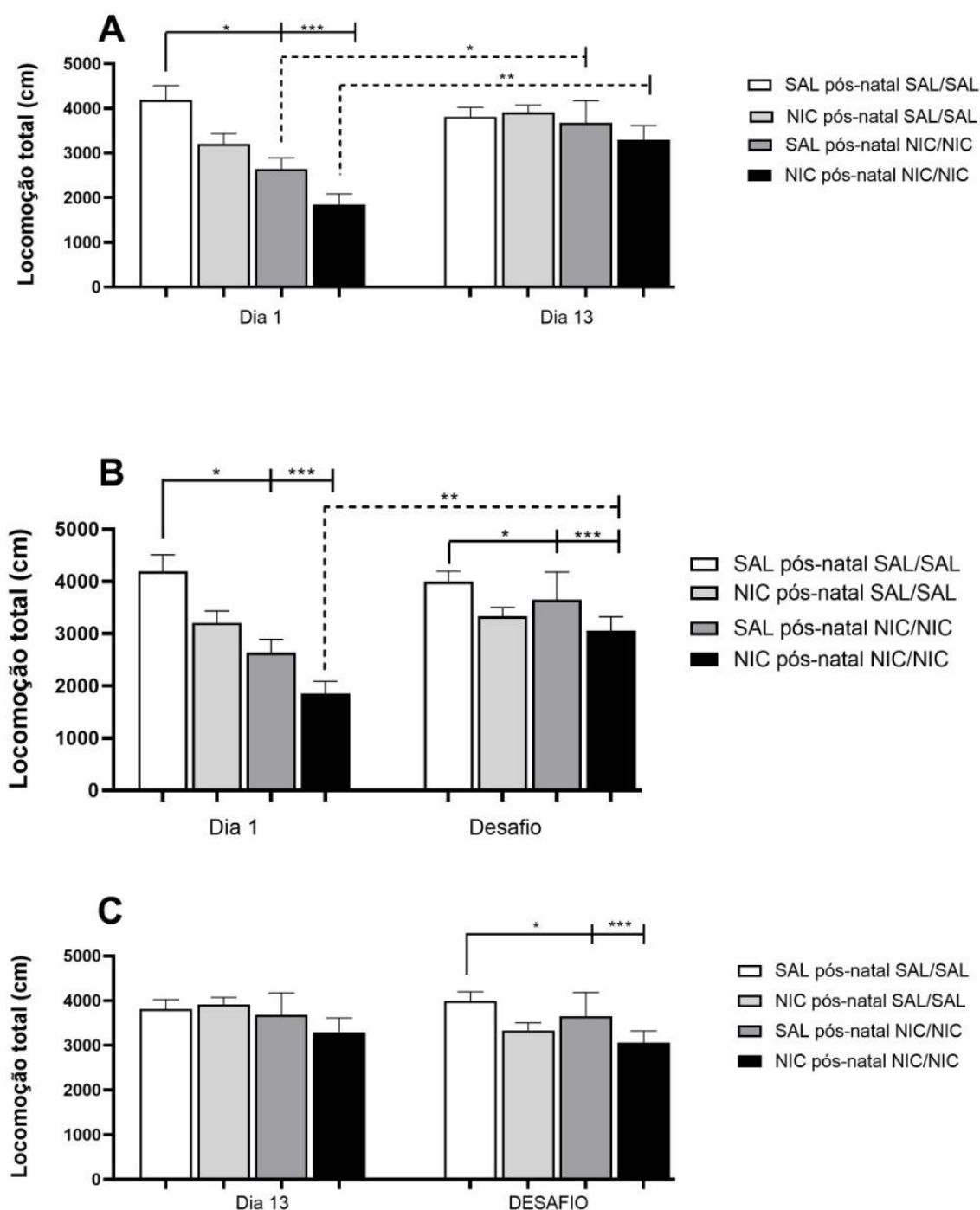
Legenda: Protocolo de sensibilização comportamental. A. Distância total percorrida em campo aberto ao longo da habituação. B. Distância total percorrida em campo aberto ao longo do processo de sensibilização e do desafio. Os animais receberam injeção (i.p) de nicotina (1 mg/Kg) ou salina e foram avaliados em campo aberto por 10 minutos.



A Figura 5A, demonstra a comparação entre o primeiro dia (D1) e o último dia (D13) da fase de aquisição. A ANOVA para medidas repetidas mostrou que houve efeito significativo de tratamento ( $F_{3,524} = 7,04$ ;  $p < 0,001$ ), efeito de tempo ( $F_{1,52} = 15,08$ ;  $p < 0,001$ ) e interação de tratamento e do tempo ( $F_{3,52} = 4,64$ ;  $p < 0,01$ ). Os resultados mostram que em D1 houve diminuição na atividade locomotora dos grupos SAL pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,05$ ) e NIC pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo SAL pós-natal SAL/SAL. Quando comparamos D13 com D1, é possível observar, que houve um aumento da atividade locomotora dos grupos SAL pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,05$ ) e NIC pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,01$ ).

Na Figura 5 B observa-se a comparação entre D1 e o Desafio (D18). A ANOVA para medidas repetidas mostrou efeito de tratamento ( $F_{3,52} = 8,74$ ;  $p < 0,001$ ) e efeito de tempo ( $F_{1,52} = 8,14$ ;  $p < 0,01$ ), além de interação entre tratamento e tempo ( $F_{3,52} = 3,28$ ;  $p < 0,05$ ). É possível observar que houve um aumento da atividade locomotora do grupo NIC pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,01$ ) entre D18 e D1, também observamos uma diminuição da atividade locomotora dos seguintes grupos SAL pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,05$ ) e NIC pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,001$ ). Com relação a comparação entre D13 e D18 não foi observada nenhuma diferença estatística, porém foi observado diminuição da atividade locomotora dos seguintes grupos SAL pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,05$ ) e NIC pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,001$ ) somente durante o Desafio.

Figura 5 - Comparação da distância total percorrida em campo aberto em D1 , D13 e Desafio



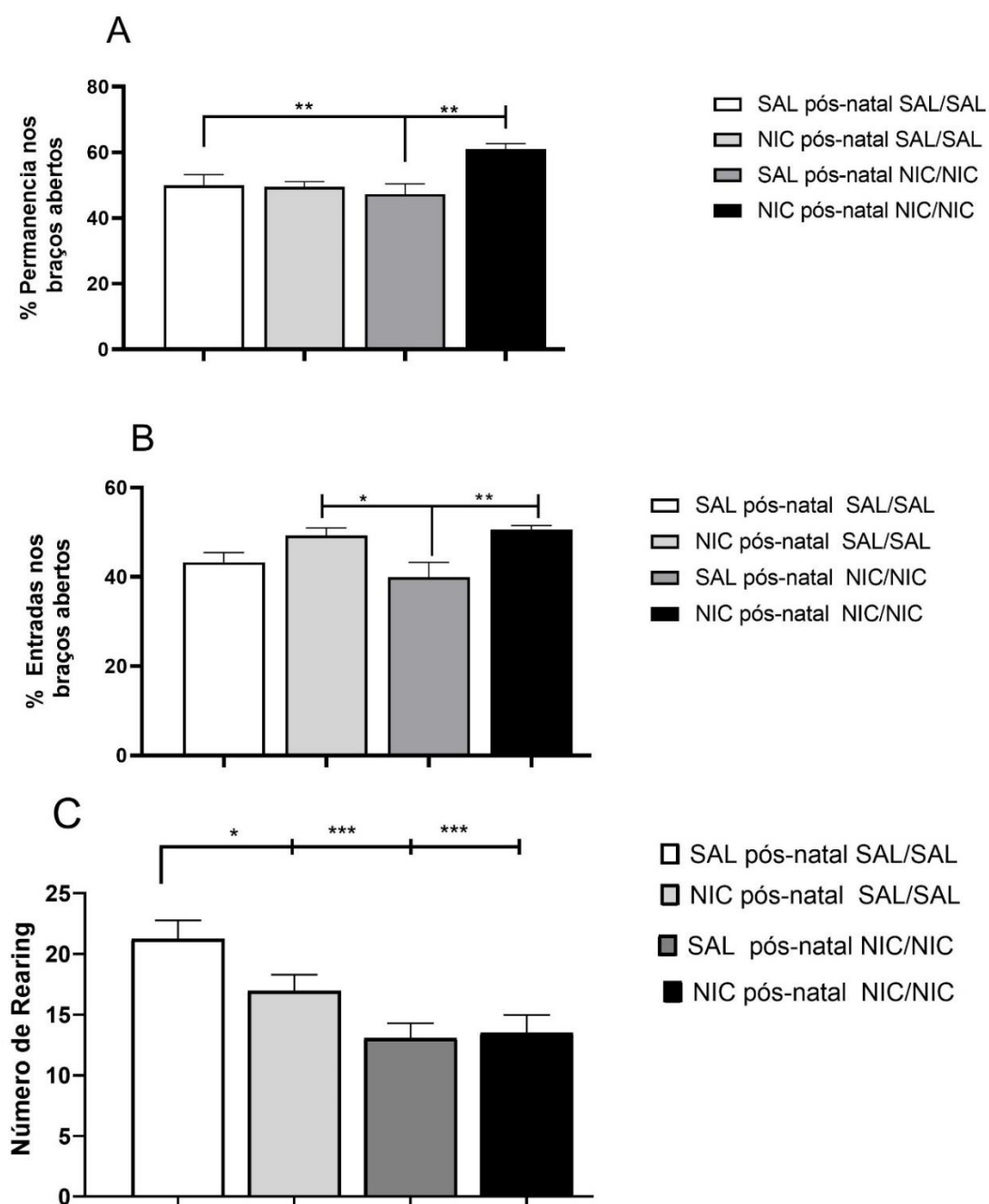
Fonte: do Autor.

Legenda: A. Comparação da distância total percorrida em campo aberto em D1 e D13. B Comparação da distância total percorrida em campo aberto em D1 e Desafio. C Comparação da distância total percorrida em campo aberto em D13 e Desafio. Grupos SAL pós-natal SAL/SAL (n=14), SAL pós-natal NIC/NIC (n= 14), NIC pós-natal SAL/SAL (n= 14), NIC pós-natal NIC/NIC (n= 14). Dados expressos em cm (média ± EPM). ANOVA para medidas repetidas, seguido do teste Newman-Keuls. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

## 7.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Os resultados obtidos no LCE são observados na Figura 6. A Figura 6A representa a porcentagem do tempo de permanência dos animais nos braços abertos. O grupo NIC pós-natal NIC/NIC apresentou um aumento significativo na permanência nos braços abertos em relação aos grupos SAL pós-natal SAL/SAL e SAL pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,01$ ). A porcentagem de entradas nos braços abertos confirma esse resultado (Figura 6B), já que houve aumento de entrada nos braços abertos no grupo NIC pós-natal NIC/NIC comparado ao grupo SAL pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,01$ ). Ainda, observamos que houve diminuição de entrada nos braços abertos no grupo SAL pós-natal NIC/NIC comparado ao grupo NIC pós-natal SAL/SAL ( $p < 0,05$ ). A Figura 6C mostra o número de *rearing*. Os grupos NIC pós-natal SAL/SAL ( $p < 0,05$ ), SAL pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,001$ ) e NIC pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,001$ ) apresentaram diminuição de *rearing* em relação ao grupo SAL pós-natal SAL/SAL.

Figura 6 – Parâmetros analisados no Labirinto em Cruz Elevado



Fonte: do Autor.

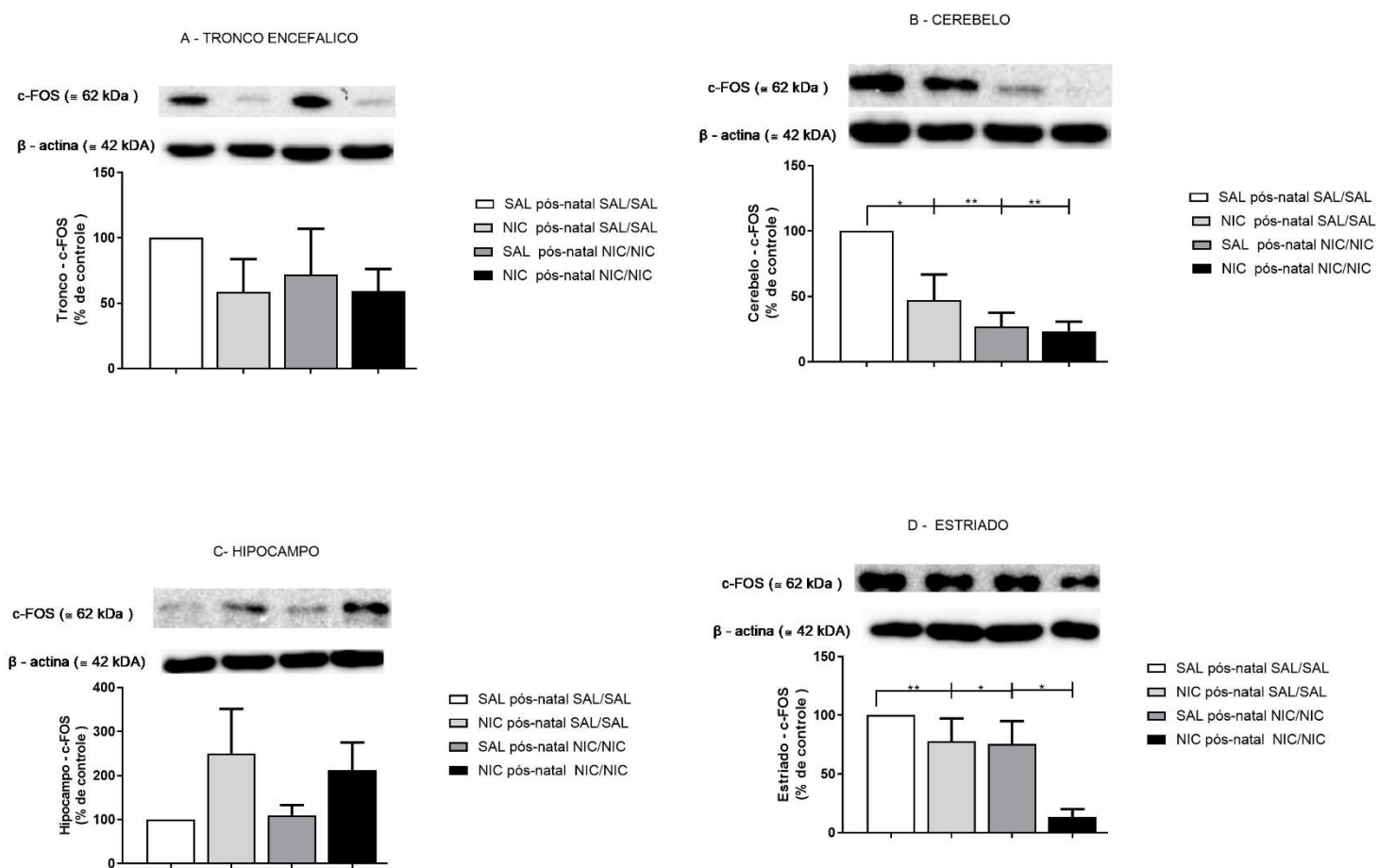
Legenda: Labirinto em cruz elevado A. Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. B. Porcentagem de entrada nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. *Rearing*. Grupos: Grupos SAL pós-natal SAL/SAL (n=14), SAL pós-natal NIC/NIC (n= 14), NIC pós-natal SAL/SAL (n= 14), NIC pós-natal NIC/NIC (n= 14). Dados expressos em porcentagem ou número absoluto (média  $\pm$  EPM). ANOVA uma via, seguido do teste Newman-Keuls. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01, \*\*\* p<0,001.

## 7.3 WESTERN BLOT

### 7.3.1 C-fos, PSD-95 e SINAPSINA I

As Figuras 7, 8 e 9 mostram a quantificação das proteínas c-Fos, PSD-95 e Sinapsina I no tronco encefálico, cerebelo, hipocampo e estriado. Os resultados da Figura 7A mostram que no cerebelo e no estriado houve diminuição na concentração de c-Fos nos grupos NIC pós-natal SAL/SAL ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ), SAL pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) e NIC pós-natal NIC/NIC ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo SAL pós-natal SAL/SAL. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na quantificação de c-Fos no tronco encefálico e no hipocampo. Além disso, nenhuma diferença estatística foi observada nas proteínas PSD-95 (Figura 8) e sinapsina I (Figura 9) em nenhuma das estruturas estudadas.

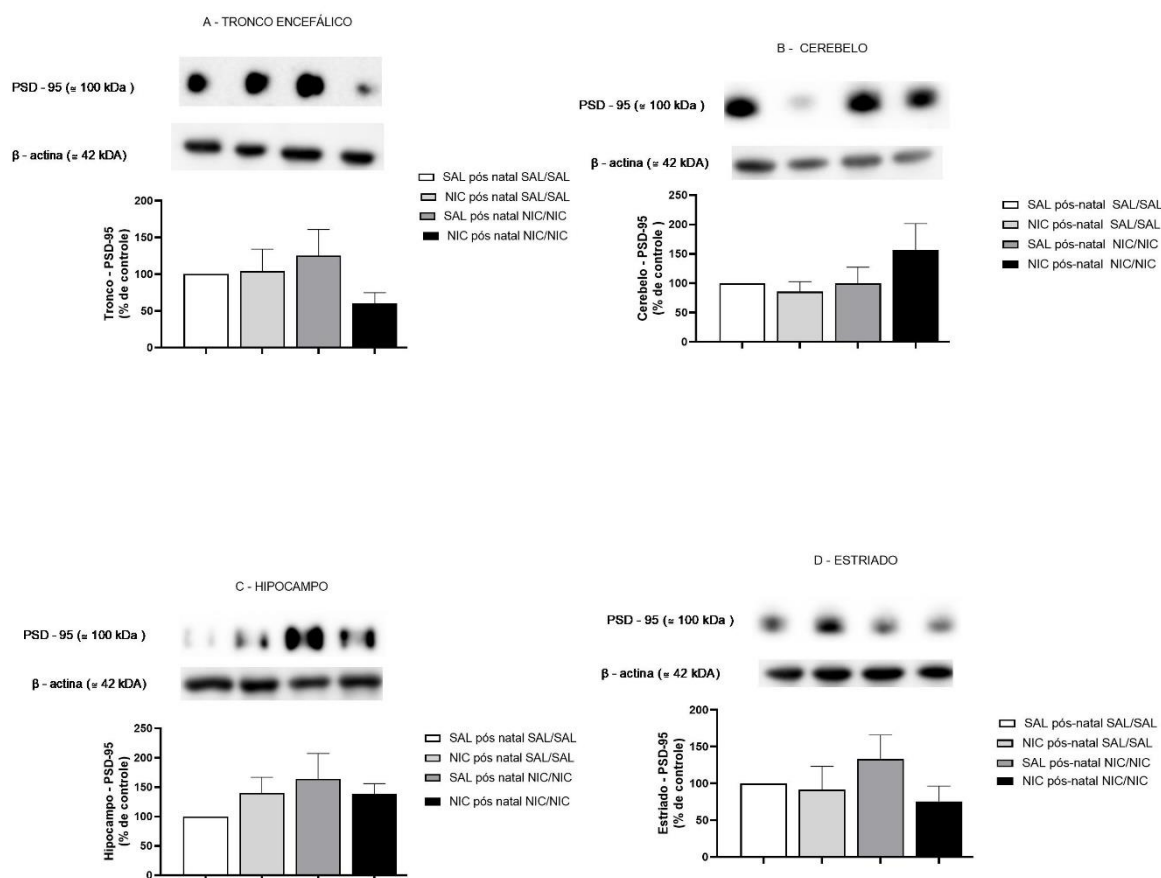
Figura 7 - Quantificação da proteína c-Fos



Fonte: do Autor.

Legenda : (A) tronco encefálico, (B) cerebelo, (C) hipocampo e (D) estriado. Grupos: Grupos SAL pós-natal SAL/SAL (n=6), SAL pós-natal NIC/NIC (n= 6), NIC pós-natal SAL/SAL (n= 6), NIC pós-natal NIC/NIC (n= 6). Dados expressos como % em relação ao controle (média ± EPM). ANOVA uma via, seguido do teste Bonferroni \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

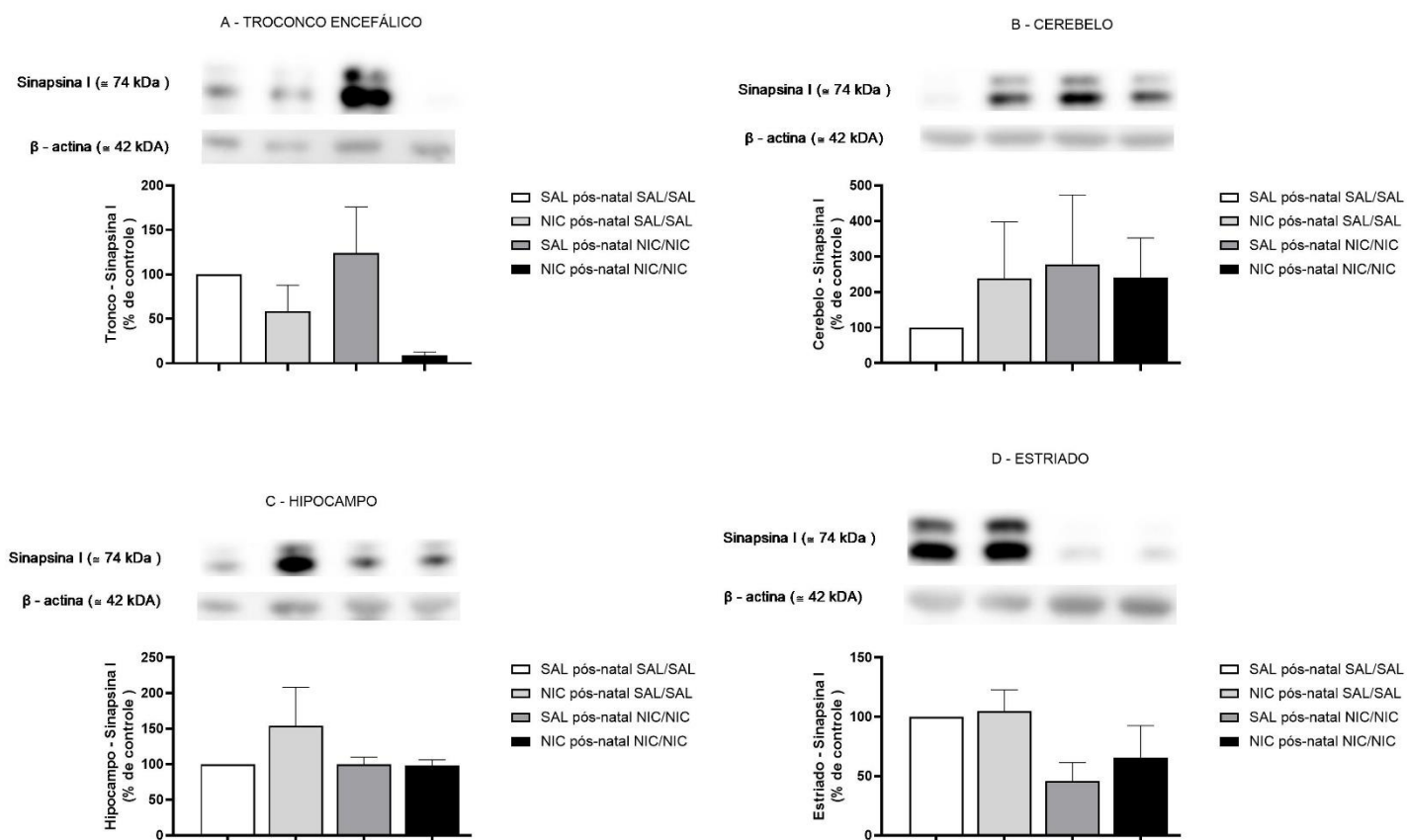
Figura 8 - Quantificação da proteína PSD-95



Fonte: do Autor.

Legenda : Quantificação da proteína PSD-95 no (A) tronco encefálico, (B) cerebelo, (C) hipocampo e (D) estriado. Grupos: Grupos SAL pós-natal SAL/SAL (n=6), SAL pós-natal NIC/NIC (n=6), NIC pós-natal SAL/SAL (n=6), NIC pós-natal NIC/NIC (n=6). Dados expressos como % em relação ao controle (média ± EPM). ANOVA uma via, seguido do teste Bonferroni.

Figura 9 - Quantificação da proteína Sinapsina I



Fonte: do Autor.

Legenda : (A) tronco encefálico, (B) cerebelo, (C) hipocampo, (D) estriado. Grupos: Grupos SAL pós-natal SAL/SAL (n=6), SAL pós-natal NIC/NIC (n= 6), NIC pós-natal SAL/SAL (n= 6), NIC pós-natal NIC/NIC (n= 6). Dados expressos como % em relação ao controle (média ± EPM). ANOVA uma via, seguido do teste Bonferroni.



## 8 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que o protocolo de exposição pós-natal à nicotina na dose de 8 mg/kg/dia nas mães, seguida pela administração de nicotina (1 mg/Kg) durante a vida adulta dos filhotes foi capaz de induzir aumento na atividade locomotora, sem que houvesse sensibilização comportamental; e diminuir a concentração de c-Fos no estriado e no cerebelo. Nenhum efeito foi observado nas proteínas sinápticas PSD-95 e sinapsina I. Em conjunto, tais resultados evidenciam a importância da análise dose-reposta da nicotina. Apesar da grande quantidade de estudos pré-clínicos com foco nos efeitos deletérios da nicotina, não existe consenso sobre o tema. Pesquisadores e profissionais de saúde discutem que os efeitos observados em roedores não são reproduzidos em humanos, sendo que um dos motivos seria a dose de nicotina utilizada nos ensaios em animais.

Nos ensaios comportamentais, a dose de 1 mg/kg de nicotina utilizada durante a fase adulta não foi capaz de induzir sensibilização comportamental, embora a exposição à nicotina no início do período pós-natal tenha contribuído para o aumento da atividade locomotora no dia do desafio e para a diminuição da ansiedade durante o período de retirada da substância.

Estudos mostram que a nicotina pode produzir aumento ou diminuição da atividade motora, dependendo da dose, da linhagem do animal, sexo e idade (SCHOCHET *et al.*, 2004; CRUZ *et al.*, 2005; ERICSON *et al.*, 2010; WATTERSON *et al.*, 2016). Animais adultos apresentaram uma sensibilização comportamental pela nicotina menos robusta com relação aos adolescentes (SCHOCHET *et al.*, 2004). Ainda, diversos estudos relatam os efeitos da exposição à nicotina durante o período gestacional e pós-natal, bem como a reexposição durante a fase adulta. Observa-se que a exposição prévia não foi capaz de provocar alterações significativas na locomoção dos machos (ROMERO *et al.*, 2004). Quando se observam as fêmeas, verifica-se uma diminuição da atividade locomotora espontânea, porém, não se encontra diferenças na atividade locomotora induzida (LESAGE *et al.*, 2006).

Nordberg *et al.* (1991) observaram diminuição na atividade locomotora induzida nos animais expostos a nicotina do 10° ao 16° dia do período pós-natal e após 4 meses. Além disso, Domino (2001) avaliou a sensibilização comportamental pela nicotina (0,32 mg/kg) em ratos adultos Sprague-Dawley. Ao longo do primeiro dia do

protocolo experimental houve uma diminuição acentuada da locomoção. Porém, após 6 dias de administração de nicotina observou-se aumento da atividade locomotora. Além disso, a dose de 0,32 mg/kg de nicotina diminuiu a locomoção depois de 4 dias de administração, o que corrobora com os nossos resultados. Apesar desses estudos, a hipoatividade observada nos grupos tratados com nicotina no primeiro dia da sensibilização comportamental do nosso trabalho difere da maioria dos dados presentes na literatura, que mostraram aumento da atividade locomotora em roedores expostos à nicotina (SCHOCHET *et al.*, 2004; CRUZ *et al.*, 2005). Ericson *et al.* (2010) relataram os efeitos do tratamento crônico com nicotina, nas doses de 0,2 mg/kg e 0,4 mg/kg. A evolução da sensibilização comportamental ocorreu de maneira semelhante para machos e fêmeas, porém, os animais machos que receberam a dose de 0,4 mg/kg apresentaram maior locomoção. Além disso, Bracken *et al.* (2001) demonstraram que animais submetidos a diferentes concentrações de nicotina por 12 dias na adolescência, influenciou o desenvolvimento da sensibilização durante a idade adulta.

A nicotina pode ser considerada um composto ansiolítico (FILE *et al.*, 1998; IRVINE *et al.*, 2000) ou ansiogênico (MANHÃES *et al.*, 2008; IÑIGUEZ *et al.*, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2015), dependendo do protocolo de exposição, como dose e período de abstinência. Durante o período de abstinência da nicotina, observa-se uma maior ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, levando ao aumento da ansiedade (GEORGE *et al.*, 2007; SIMPSON *et al.*, 2020). Ainda, o aumento da ansiedade pode ocorrer por meio de alterações no sistema neuropeptídeo Y (SLAWECKI *et al.*, 2005), que está relacionado a diversas funções a regulação da alimentação, ansiedade, medo e estresse, além de contribuir para homeostase do sistema esquelético e do metabolismo (EVA *et al.*, 2020; NAHVI *et al.*, 2020). A exposição à nicotina durante o período de gestacional e/ou lactação, leva ao aumento de ansiedade em diferentes momentos da prole (EPPOLITO *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2015), enquanto a exposição à nicotina durante a adolescência reflete em ansiedade na idade adulta (IÑIGUEZ *et al.*, 2009). Ainda, a abstinência pela nicotina na idade adulta também leva a aumento da ansiedade (MANHÃES *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, o teste de labirinto em cruz elevado foi realizado com três dias de retirada da substância, o que caracteriza um curto período de abstinência e que pode justificar o efeito ansiolítico observado. Kupferschmidt *et al.* (2010) também

observaram efeito ansiolítico após administração de nicotina em roedores durante a adolescência e na idade adulta. Os animais que receberam a dose de 0,4 mg/kg de nicotina apresentaram aumento do número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado. SCHNEIDER *et al.* (2012) mostraram os roedores que tiveram uma exposição a nicotina ao longo do período gestacional apresentaram uma porcentagem maior no número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado em relação ao grupo que não foi exposto neste período.

Estudos relacionam o *rearing*, comportamento em que o animal fica em pé sob as patas traseiras, à ansiedade, sendo que a administração de ansiolíticos como benzodiazepínicos leva à diminuição da frequência do *rearing* (BRITTON E BRITTON.,1981; WANDA., *et al.* 2015; KHAN *et al.*, 2016; FRAGA *et al.*, 2018). No presente estudo, o resultado de *rearing* foi coerente com os observados no tempo de permanência e do número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, o que colabora para a sugestão de que a administração de nicotina durante o período pós-natal seguida da administração de nicotina na fase adulta é capaz de produzir efeito ansiolítico durante o curto período de retirada da substância na fase adulta.

Em nosso estudo, observamos que a administração de nicotina durante o período pós-natal, seguida ou não de exposição na fase adulta, é capaz de diminuir a concentração de c-Fos no estriado e no cerebelo. A proteína c-Fos, em conjunto com outras proteínas da família FOS, são utilizadas em estudos de mapeamento funcional de áreas do SNC, como marcador de atividade neuronal. A expressão de c-Fos está ligada a fatores neurotróficos, neurotransmissores e o aumento de cálcio. Dessa forma estudos sobre transtorno de uso de substância, como é o caso de cocaína, heroína e nicotina, utilizam-se desta proteína para avaliação dos circuitos neuronais envolvidos em áreas que essas substâncias atuam no SNC (KOVÁCS, 1998; CRUZ; *et al.*, 2015).

Estudos mostram que a administração de nicotina durante a gestação, adolescência ou fase adulta leva a aumento de c-Fos no *núcleo accumbens*, componente do sistema recompensa (PARK *et al.*, 2006; SHRAM *et al.*, 2007). Porém, de acordo com o estudo de Hsu *et al.* (2007), o estresse de restrição associado com a administração de nicotina pode estar relacionado a diminuição da expressão de c-Fos em algumas regiões do encéfalo, como o núcleo paraventricular talâmico e no núcleo basolateral da amígdala.

Trabalhos anteriores mostram que a concentração de sinapsina I e de PSD95 pode ser alterada pela exposição à fumaça do cigarro ou pela nicotina dependendo do protocolo de exposição. Diversos estudos mostram que a exposição à fumaça do cigarro ou à nicotina isolada leva a diminuição da concentração de sinapsina I e/ou de PSD95 em diferentes regiões encefálicas (Torres *et al.*, 2015; Torres *et al.* 2019; Parameshwaran *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2020). Por outro lado, Wang *et al.* (2011) mostram que a exposição gestacional à nicotina está relacionada ao aumento da expressão de PSD95 e Jackson *et al.* (2009) observaram que a exposição aguda à nicotina leva a fosforilação da sinapsina I, efeito dependente de sua ação em receptores nicotínicos  $\beta 2$ . Ao contrário de tais estudos, o protocolo de exposição utilizado no presente trabalho não levou a diferenças significativas na concentração de sinapsina I ou PSD95 em nenhuma estrutura encefálica.

Em suma, o nosso estudo mostrou que a exposição à nicotina durante o início do período pós-natal não predispôs à sensibilização comportamental na fase adulta. Contudo, este resultado pode ter ocorrido devido a dose utilizada no protocolo de sensibilização comportamental, uma vez que a exposição à nicotina no início do período pós-natal contribuiu para o aumento da atividade locomotora no dia do desafio e para a diminuição da ansiedade durante o período de retirada da substância. Ainda, a administração de nicotina durante o período pós-natal seguida da administração de nicotina na fase adulta foi capaz de diminuir a concentração de c-Fos em regiões importantes no desenvolvimento do SNC.

## 9 CONCLUSÕES

1. A administração de nicotina (1 mg/Kg) durante sete dias alternados na fase adulta de camundongos que receberam nicotina durante o início do período pós-natal é capaz de induzir aumento da atividade locomotora, porém não houve o desenvolvimento do processo de sensibilização comportamental.
2. A administração de nicotina durante o período pós-natal e seguida por exposição na fase adulta é capaz de produzir efeito ansiolítico durante o período de retirada da substância na fase adulta.
3. A administração de nicotina durante o período pós-natal, seguida ou não de exposição na fase adulta, é capaz de diminuir a concentração de c-Fos no estriado e no cerebelo, embora não tenham efeito na concentração de PSD-95 e de sinapsina I.

## REFERÊNCIAS

- AJAREM, J. Prenatal nicotine exposure modifies behavior of mice through Early Development. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.313-318, Feb. 1998.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS COMMITTEE ON DRUGS. Transfer of drugs and other chemicals into human milk. **Pediatrics**, v. 108, n. 3, p. 776, 2001.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-5: manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. São Paulo: Artmed, 2014.
- ANDERSON, S.M. *et al.* Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 106, n. 3, p. 389-403, June. 2005. Elsevier BV.
- ANDERSSON, Ulf *et al.* Reflex principles of immunological homeostasis. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 313-335, Apr. 2012. Annual Review.
- APILAM. **Is it compatible with breastfeeding?.[s.l.n]**, 2021 e-lactancia. Disponível em : <https://apilam.org/e-lactancia>. Acesso: em 6 May 2021.
- BAI, Jiuwu *et al.* Smoking cessation affects the natural history of COPD. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, [s.l.], v. 12, p.3323-3328, Nov. 2017. Dove Medical Press Ltd.
- BALSEVICH, Georgia *et al.* The effects of pre- and post-natal nicotine exposure and genetic background on the striatum and behavioral phenotypes in the mouse. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 266, p. 7-18, June 2014. Elsevier
- BAYER, Sh A. *et al.* Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. **Neurotoxicology (Park Forest South)**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 83-144, 1993.
- BÉRARD, Anick *et al.* Success of smoking cessation interventions during pregnancy. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 215, n. 5, p. 1-8, Nov. 2016. Elsevier BV.
- BHATTACHARYA, Dwipayan *et al.* Assessment of the cerebellar neurotoxic effects of nicotine in prenatal alcohol exposure in rats. **Life Sciences**, [s.l.], v. 194, p.177-184, Feb. 2018. Elsevier BV.
- BHATTACHARYA, Dwipayan *et al.* Concurrent nicotine exposure to prenatal alcohol consumption alters the hippocampal and cortical neurotoxicity. **Heliyon**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 1-10, Jan. 2020. Elsevier BV.
- BRACKEN, Amy L. *et al.* Nicotine exposure during adolescence enhances behavioral sensitivity to nicotine during adulthood in Wistar rats. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 99, n. 1, p.87- 93, July 2011. Elsevier BV.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Programa nacional de controle do tabagismo e outros fatores de risco** – Brasil. Rio de Janeiro, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **III levantamento nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira**. Rio de Janeiro, 2017. 528 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Atenção à Saúde. **Amamentação e uso de medicamentos e outras substâncias**. 2. ed. – Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigitel. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 Estados brasileiros e no Distrito Federal em 2013**. Brasília, 2017. v. 160.

BRITTON, Angela F. *et al.* Perinatal nicotine exposure eliminates peak in nicotinic acetylcholine receptor response in adolescent rats. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [s.l.], v. 320, n. 2, p. 871-876, Nov. 2006.

BRITTON, Donald R. *et al.* A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 577-582, Oct. 1981. Elsevier BV

BUDZYNSKA, Barbara *et al.* Effects of imperatorin on nicotine-induced anxiety- and memory-related responses and oxidative stress in mice. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 122, p.46-55, Oct. 2013. Elsevier BV

BUTTON, T. M. M.; THAPAR, A.; MCGUFFIN, P. Relationship between antisocial behaviour, attention-deficit hyperactivity disorder and maternal prenatal smoking. **British Journal Of Psychiatry**, [s.l.], v. 187, n. 2, p. 155-160, Aug. 2005. Royal College of Psychiatrists

CALVARESI, Valeria *et al.* Transfer of nicotine, cotinine and caffeine into breast milk in a smoker mother consuming caffeinated drinks. **Journal Of Analytical Toxicology**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.473-477, Apr. 2016. Oxford University Press (OUP).

CAMARINI, Rosana *et al.* Behavioral sensitization to ethanol: neural basis and factors that influence its acquisition and expression. **Brain Research Bulletin**, [s.l.], v. 125, p. 53-78, July 2016. Elsevier BV

CARDINALE, Alessio *et al.* Nicotine: specific role in angiogenesis, proliferation and apoptosis. **Critical Reviews in Toxicology**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.68-89, Nov. 2011. Informa UK Limited.

CAVALCANTE, Tânia Maria *et al.* Conhecimento e uso de cigarros eletrônicos e percepção de risco no Brasil: resultados de um país com requisitos regulatórios rígidos. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 1-11, set. 2017. FapUNIFESP (SciELO).

CELIK, Eylem *et al.* Caffeine and amphetamine produce cross-sensitization to nicotine-induced locomotor activity in mice. **Progress In Neuro Psychopharmacology And Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 50-55, Jan. 2006. Elsevier BV.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **User guide to the 2013 natality public use file centers for disease control and prevention.** Maryland, 2014. Disponível em :2013ftp://ftp.cdc.gov/pub/Health\_Statistics/NCHS/Dataset\_Documentation/DVS/natality/UserGuide2013.pdf. Acesso em : 20 Jan. 2021.

CHENG, Dongmei *et al.* Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s.l.], v. 5, n. 6, p. 1158-1170, June 2006. Elsevier BV.

CHEN, Hui *et al.* Brain health is independently impaired by E-vaping and high-fat diet. **Brain, Behavior, And Immunity**, [s.l.], v. 92, p. 57-66, Feb. 2021. Elsevier

CESCA, F. *et al.* The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. **Progress In Neurobiology**, [s.l.], v. 91, n. 4, p. 313-348, Aug. 2010. Elsevier BV.

COLEY, Austin A. *et al.* PSD95: a synaptic protein implicated in schizophrenia or autism?. **Progress In Neuro-Psychopharmacology And Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 82, p. 187-194, Mar. 2018. Elsevier BV.

COZANNET, Romain Le *et al.* Extended-access, but not limited-access, methamphetamine self-administration induces behavioral and nucleus accumbens dopamine response changes in rats. **European Journal Of Neuroscience**, [s.l.], v. 38, n. 10, p. 3487-3495, Sept. 2013. Wiley.

CRUCEANU, Cristiana *et al.* Epigenetic Regulation of Synapsin Genes in Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 38, n. 1, p. 239-241, Nov. 2012. Springer Science and Business Media LLC.

CRUZ, Fábio C. *et al.* Differential behavioral and neuroendocrine effects of repeated nicotine in adolescent and adult rats. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 80, n. 3, p. 411-417, Mar. 2005. Elsevier BV.

CRUZ, Fabio C. *et al.* Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. **Brain Research**, [s.l.], v. 1628, p. 157-173, Dec. 2015. Elsevier BV.

CSORDAS, Adam *et al.* The biology behind the atherothrombotic effects of cigarette smoke. **Nature Reviews Cardiology**, [s.l.], v. 10, n. 4, p. 219-230, 5 Feb. 2013. Springer Science and Business Media LLC.

DELIJEWSKI, Marcin *et al.* The effect of simultaneous exposure of HEMn-DP and HEMn-LP melanocytes to nicotine and UV-radiation on the cell viability and



melanogenesis. **Environmental Research**, [s.l.], v. 151, p.44-49, Nov. 2016. Elsevier BV

DI CHIARA, G. di *et al.* Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 85, n. 14, p. 5274-5278, July 1988. Proceedings of the National Academy of Sciences.

DIFRANZA, Joseph *et al.* A sensitization–homeostasis model of nicotine craving, withdrawal, and tolerance: integrating the clinical and basic science literature. **Nicotine & Tobacco Research**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 9-26, 1 Feb. 2005. Oxford University Press (OUP).

DINGMAN, Marc A *et al.* Age-specific locomotor response to nicotine in yellow and mottled yellow *Avy/a* mice. **Bmc Research Notes**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 497, 2013. Springer Science and Business Media LLC.

DOMINGUES, Rosa Maria Soares Madeira *et al.* Prevalence of pre-gestational and gestational smoking and factors associated with smoking cessation during pregnancy, Brazil, 2011-2012. **Plos One**, [s.l.], v. 14, n. 5, p. 1-15, May 2019. Public Library of Science (PLoS).

DOMINO, Edward F. Nicotine induced behavioral locomotor sensitization. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 25, n. 1, p. 59-71, 2001.

DOREA, Jose G.. Maternal Smoking and Infant Feeding: breastfeeding is better and safer. **Maternal And Child Health Journal**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 287-291, 17 Jan. 2007. Springer Science and Business Media LLC.

DOUCET, Marika V. *et al.* The PSD-95/nNOS complex: new drugs for depression?. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 133, n. 2, p. 218-229, Feb. 2012. Elsevier BV.

DROPE J., *et al.* **The Tobacco Atlas**. Atlanta: American Cancer Society and Vital Strategies., 2018

DWYER, Jennifer B. *et al.* Nicotine and brain development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, [s.l.], v. 84, n. 1, p. 30-44, 2008. Wiley.

DWYER, Jennifer B. *et al.* The dynamic effects of nicotine on the developing brain. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 122, n. 2, p. 125-139, May. 2009. Elsevier

EINARSON, Adrienne *et al.* Smoking in pregnancy and lactation: a review of risks and cessation strategies. **European Journal Of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 65, n. 4, p. 325-330, Jan. 2009. Springer Science and Business Media LLC.

E-LACTANCIA. **e-lactancia**, 2021 Is it compatible with breastfeeding ? . Disponível em : <http://www.e-lactancia.org>. Acesso em: 6 May.2021.

ELLENBROEK, Bart; YOUN, Jiun. Drug Addiction. **Gene-environment Interactions In Psychiatry**, [s.l.], p.143-172, 2016. Elsevier.

ELLIOTT, Brenda M *et al.* Effects of nicotine on elevated plus maze and locomotor activity in male and female adolescent and adult rats. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 77, n. 1, p.21-28, Jan. 2004. Elsevier BV.

ENNACEUR, A.. Tests of unconditioned anxiety — Pitfalls and disappointments. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 135, p. 55-71, Aug. 2014

EPPOLITO, Amy K. *et al.* Late emerging effects of prenatal and early postnatal nicotine exposure on the cholinergic system and anxiety-like behavior. **Neurotoxicology And Teratology**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.336-345, May 2010. Elsevier BV.

ERICSON, Mia *et al.* Behavioral sensitization to nicotine in female and male rats. **Journal Of Neural Transmission**, [s.l.], v. 117, n. 9, p. 1033-1039, 7 Aug. 2010. Springer Science and Business Media LLC

ERNST, Monique; MOOLCHAN, Eric T.; ROBINSON, Miquon L.. Behavioral and neural consequences of prenatal exposure to nicotine. **Journal Of The American Academy Of Child & Adolescent Psychiatry**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.630-641, June 2001. Elsevier BV

EVA, Carola *et al.* Sex differences in behavioral and metabolic effects of gene inactivation: the neuropeptide y and y receptors in the brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 119, p. 333-347, Dec. 2020. Elsevier BV.

EVERITT, Barry J *et al.* Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nature Neuroscience**, [s.l.], v. 8, n. 11, p. 1481-1489, Oct. 2005. Springer Science and Business Media LLC.

FARIVAR, Reza *et al.* Cellular-resolution activity mapping of the brain using immediate-early gene expression. **Frontiers In Bioscience**, [s.l.], v. 9, n. 1-3, p. 104, 2004. Bioscience Research Institute Pte. Ltd.

FILE, Sandra E. *et al.* Behavioural and biochemical measures of stress in hooded rats from different sources. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 22, n. 1, p. 31-35, Jan. 1979. Elsevier BV.

FILE, Sandra E. *et al.* Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus. **Behavioral Neuroscience**, [s.l.], v. 112, n. 6, p. 1423-1429, 1998. American Psychological Association (APA).

FERREIRA, Adriana *et al.* distinct roles of synapsin i and synapsin ii during neuronal development. **Molecular Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 22-28, Jan. 1998. Springer Science and Business Media LLC.

FILIPPIDIS, Filippos T *et al.* Two-year trends and predictors of e-cigarette use in 27 European Union member states. **Tobacco Control**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 98-104, 24 May 2016. BMJ.

FRAGA, Daiane B. *et al.* Anxiolytic effects of ascorbic acid and ketamine in mice. **Journal Of Psychiatric Research**, [s.l.], v. 100, p. 16-23, May 2018. Elsevier BV.

FOCCHI, Guilherme Rubino de A. *et al.* Tratamento farmacológico do tabagismo. **Archives Of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, [s.l.], v. 32, n. 5, p. 267-275, out. 2005. FapUNIFESP (SciELO)

GALÃO, Adriani Oliveira *et al.* Efeitos do fumo materno durante a gestação e complicações perinatais. **Revista HCPA**. Porto Alegre. Vol. 29, n. 3 (2009), p. 218-224, 2009.

GALLO, Francisco T. *et al.* Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: focus on c-fos, egr1 and arc. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**, [s.l.], v. 12, p. 1-16, 25 Apr. 2018. Frontiers Media SA

GRAY, Peter *et al.* Effects of lithium on open field behavior in stressed and unstressed rats. **Psychopharmacology**, [s.l.], v. 48, n. 3, p. 277-281, 1976. Springer Science and Business Media LLC.

GEORGE, O. *et al.* CRF CRF1 system activation mediates withdrawal-induced increases in nicotine self-administration in nicotine-dependent rats. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 104, n. 43, p. 17198-17203, 5 out. 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences.

GOLDSTEIN, Rita Z. *et al.* Drug Addiction and Its Underlying Neurobiological Basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. **American Journal Of Psychiatry**, [s.l.], v. 159, n. 10, p. 1642-1652, Oct. 2002. American Psychiatric Association Publishing.

GOODCHILD, Mark *et al.* Global economic cost of smoking-attributable diseases. **Tobacco Control**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 58-64, Jan. 2017. BMJ.

GUSELLA, J. L. *et al.* Effects of maternal social drinking and smoking on offspring at 13 months. **Neurobehavioral toxicology and teratology**, v. 6, n. 1, p. 13-17, 1984.

HAWKEY, Andrew B. *et al.* Paternal nicotine exposure in rats produces long-lasting neurobehavioral effects in the offspring. **Neurotoxicology And Teratology**, [s.l.], v. 74, p.106808-106818, July 2019. Elsevier BV

HOLBROOK, Bradley D.. The effects of nicotine on human fetal development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, [s.l.], v. 108, n. 2, p. 181-192, June 2016. Wiley.

HOLLIDAY, Erica D. *et al.* Long-term effects of chronic nicotine on emotional and cognitive behaviors and hippocampus cell morphology in mice: comparisons of adult and adolescent nicotine exposure. **European Journal Of Neuroscience**, [s.l.], v. 44, n. 10, p.2818-2828, Oct. 2016

HOSAKA, Masahiro *et al.* A Phospho-Switch Controls the Dynamic Association of Synapsins with Synaptic Vesicles. **Neuron**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. 377-387, Oct. 1999. Elsevier BV

HUANG, Luping Z. *et al.* Chronic neonatal nicotine increases anxiety but does not impair cognition in adult rats. **Behavioral Neuroscience**, [s.l.], v. 121, n. 6, p. 1342-1352, 2007. American Psychological Association (APA).

HSU, Hui-Ru *et al.* Acute effects of nicotine on restraint stress-induced anxiety-like behavior, c-Fos expression, and corticosterone release in mice. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 566, n. 1-3, p. 124-131, July 2007. Elsevier BV.

HYMAN, Steven E. *et al.* NEURAL MECHANISMS OF ADDICTION: the role of reward-related learning and memory. **Annual Review Of Neuroscience**, [s.l.], v. 29, n. 1, p. 565-598, July. 2006. Annual Reviews.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil) ; Mortalidade atribuível ao tabagismo passivo na população urbana do Brasil, 2008 [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br).

IÑIGUEZ, Sergio D *et al.* Nicotine exposure during adolescence induces a depression-like state in adulthood. **Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 34, n. 6, p. 1609-1624, 17 Dec. 2008. Springer Science and Business Media LLC.

IRVINE, E.e. *et al.* Nicotine self-administration and withdrawal: modulation of anxiety in the social interaction test in rats. **Psychopharmacology**, [s.l.], v. 153, n. 3, p. 315-320, 1 Dec. 2000. Springer Science and Business Media LLC.

JACKSON, Kia J. *et al.* Beta2-containing nicotinic acetylcholine receptors mediate calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II and synapsin I protein levels in the nucleus accumbens after nicotine withdrawal in mice. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 701, n. 1-3, p. 1-6, Feb. 2013. Elsevier BV.

JAWORSKI, Jacek; *et al.* C-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek's theory. **Acta Neurobiol Exp**, Warsaw, n. 78, p. 287-296, 2018.

KHAN, Abdul Waheed *et al.* Anticonvulsant, Anxiolytic, and Sedative Activities of Verbena officinalis. **Frontiers In Pharmacology**, [s.l.], v. 7, p. 1-17, 21 Dec. 2016. Frontiers Media SA

KIM, Chang Seong *et al.* Nicotine-induced apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 1-17, 30 Mar. 2016. Public Library of Science (PLoS).

KIM, Eunjoon *et al.* PDZ domain proteins of synapses. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 5, n. 10, p. 771-781, Oct. 2004. Springer Science and Business Media LLC.

KREYBERG, I. *et al.* An update on prevalence and risk of snus and nicotine replacement therapy during pregnancy and breastfeeding. **Acta Paediatrica**, [s.l.], v. 108, n. 7, p. 1215-1221, Feb. 2019. Wiley.

KOVÁCS, K J. *et al.* Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 287-297, Oct. 1998. Elsevier BV.

KOVÁCS, K. J. *et al.* Measurement of Immediate-Early Gene Activation-c-fos and Beyond. **Journal Of Neuroendocrinology**, [s.l.], v. 20, n. 6, p. 665-672, June 2008. Wiley

KOOB, George F. *et al.* Neurocircuitry of Addiction. **Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 35, n. 1, p. 217-238, 26 Aug. 2009. Springer Science and Business Media LLC.

KOOB, George F. *et al.* Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. **The Lancet Psychiatry**, [s.l.], v. 3, n. 8, p. 760-773, Aug. 2016. Elsevier BV.

KUPFERSCHMIDT, David A. *et al.* Age-related effects of acute nicotine on behavioural and neuronal measures of anxiety. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 213, n. 2, p.288-292, Dec. 2010. Elsevier BV.

LAHUNTA, Alexander de. *et al.* Embryonic development of the central nervous system. **Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice**, [s.l.], v. 46, n. 2, p. 193-216, Mar. 2016. Elsevier BV

LAMBERS, Donna S. *et al.* The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. **Seminars In Perinatology**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 115-126, Apr. 1996. Elsevier BV.

LAW, Karen L. *et al.* Smoking during pregnancy and newborn neurobehavior. **PEDIATRICS-SPRINGFIELD-**, v. 111, n. 6; PART 1, p. 1318-1323, 2003.

LEE, Jungun *et al.* Influence of maternal environmental tobacco smoke exposure assessed by hair nicotine levels on birth weight. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, [s.l.], v. 16, n. 7, p.3029-3034, 14 Apr. 2015. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention.

- LESAGE, M *et al.* Effects of maternal intravenous nicotine administration on locomotor behavior in pre-weanling rats. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 85, n. 3, p.575-583, Nov. 2006. Elsevier BV
- LUBIN, Jay H. *et al.* Risk of cardiovascular disease from cumulative cigarette use and the impact of smoking intensity. **Epidemiology**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.395-404, May 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).
- LV, Juanxiu *et al.* The effect of prenatal nicotine on expression of nicotine receptor subunits in the fetal brain. **Neurotoxicology**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.722-726, July. 2008. Elsevier BV
- MACNICOL, Brent. The biology of addiction. **Canadian Journal Of Anesthesia/journal Canadien D'anesthésie**, [s.l.], v. 64, n. 2, p.141-148, 11 Nov. 2016. Springer Nature
- MAHAR, Ian *et al.* Developmental hippocampal neuroplasticity in a model of nicotine replacement therapy during pregnancy and breastfeeding. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 5, p. 1-9, 15 May 2012. Public Library of Science (PLoS).
- MANHÃES, Alex C. *et al.* Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 193, n. 2, p. 216-224, Nov. 2008. Elsevier BV.
- MARITZ, G. Maternal nicotine exposure: response of type ii pneumocytes of neonatal rat pups.. **Cell Biology International**, [s.l.], v. 19, n. 4, p. 323-332, Apr. 1995. Wiley
- MARTINS, A.P. **Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos**. 2009. 85f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009
- MATHIEU-KIA, Anne-Marie *et al.* Inducibility of c-Fos protein in visuo-motor system and limbic structures after acute and repeated administration of nicotine in the rat. **Synapse**, [s.l.], v. 29, n. 4, p. 343-354, Aug. 1998. Wiley.
- MCMILLEN, Robert C. *et al.* Trends in electronic cigarette use among u.s. adults: use is increasing in both smokers and nonsmokers. **Nicotine & Tobacco Research**, [s.l.], v. 17, n. 10, p. 1195-1202, 6 Nov. 2014. Oxford University Press (OUP)
- MELLO, Paulo Roberto Bezerra de *et al.* Influência do tabagismo na fertilidade, gestação e lactação. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], v. 77, n. 4, p. 257-264, Aug. 2001. FapUNIFESP (SciELO).
- MENDELSON, Colin *et al.* Management of smoking in pregnant women. **Australian family physician**, v. 43, n. 1/2, p. 46, 2014.

MIRZA, Fatima Javed *et al.* The role of synapsins in neurological disorders. **Neuroscience Bulletin**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 349-358, 27 Dec. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

MOHAMMADI, Somayeh *et al.* Toxic compounds from tobacco in placenta samples analyzed by UPLC-QTOF-MS. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 145, p.331-338, Oct. 2017. Elsevier BV.

MOHEIMANI, Roya S. *et al.* Increased cardiac sympathetic activity and oxidative stress in habitual electronic cigarette users. **Jama Cardiology**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.278-296, 1 Mar. 2017. American Medical Association (AMA)

MORUD, Julia *et al.* Progressive modulation of accumbal neurotransmission and anxiety-like behavior following protracted nicotine withdrawal. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 128, p.86-95, Jan. 2018. Elsevier BV.

MOURA-RIBEIRO, M. V. L. ; GONÇALVES, V. M. G. **Neurologia do desenvolvimento da criança**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.p. 109-130.

MUND, Mathias *et al.* Smoking and pregnancy — a review on the first major environmental risk factor of the unborn. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s.l.], v. 10, n. 12, p.6485- 6499, Nov. 2013. MDPI AG

NAHVI, Roxanna J. *et al.* Sex Differences in the neuropeptide Y system and implications for stress related disorders. **Biomolecules**, [s.l.], v. 10, n. 9, p. 1248, Aug. 2020. MDPI AG

NAPIERALA, Marta *et al.* Tobacco smoking and breastfeeding: effect on the lactation process, breast milk composition and infant development. a critical review. **Environmental Research**, [s.l.], v. 151, p. 321-338, Nov. 2016. Elsevier BV

NAVARRO, H. A. *et al.* Prenatal exposure to nicotine impairs nervous system development at a dose which does not affect viability or growth. **Brain Research Bulletin**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.187-192, Sept. 1989.

NESTLER, E. J. *et al.* FosB: a sustained molecular switch for addiction. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 98, n. 20, p. 11042-11046, Sept. 2001. Proceedings of the National Academy of Sciences.

NESTLER, E. J. *et al.* Molecular mechanisms of drug addiction. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 47, p. 24-32, Jan. 2004. Elsevier BV.

NOGUCHI, K. *et al.* Preproenkephalin mRNA in spinal dorsal horn neurons is induced by peripheral inflammation and is co-localized with Fos and Fos-related proteins. **Neuroscience**, [s.l.], v. 46, n. 3, p. 561-570, Feb. 1992. Elsevier BV.

NORDBERG, Agneta *et al.* Neonatal nicotine exposure induces permanent changes in brain nicotinic receptors and behaviour in adult mice. **Developmental Brain Research**, [s.l.], v. 63, n. 1-2, p.201-207, Nov. 1991. Elsevier BV.

NUNES-FREITAS, A. L. *et al.* Nicotine exposure during the third trimester equivalent of human gestation: time course of effects on the central cholinergic system of rats. **Toxicol Sci.** 2011; 123(1):144-154. June. 2011. Oxford University Press (OUP).

ÖBERG, Mattias *et al.* Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. **The Lancet**, [s.l.], v. 377, n. 9760, p.139-146, Jan. 2011. Elsevier BV.

O'DONNELL, Kelley C. *et al.* The behavioral actions of lithium in rodent models: leads to develop novel therapeutics. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 31, n. 6, p. 932-962, Jan. 2007. Elsevier BV.

PARAMESHWARAN, Kodeeswaran *et al.* Developmental nicotine exposure induced alterations in behavior and glutamate receptor function in hippocampus. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 69, n. 5, p.829-841, 28 Oct. 2011. Springer Science and Business Media LLC.

PARK, Minjung K. *et al.* Gestational nicotine-induced changes in adolescent neuronal activity. **Brain Research**, [s.l.], v. 1094, n. 1, p. 119-126, June. 2006. Elsevier BV

PELLOW, Sharon *et al.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal Of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 149-167, Aug. 1985. Elsevier BV

PEREIRA, Priscilla Perez da Silva *et al.* Maternal active smoking during pregnancy and low birth weight in the americas: A Systematic review and meta-analysis. **Nicotine & Tobacco Research**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.497-505, 11 Apr. 2017. Oxford University Press

PETERS, David A.V. *et al.* Sex-dependent biological changes following prenatal nicotine exposure in the rat. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 17, n. 5, p. 1077-1082, Nov. 1982. Elsevier BV

PIERCE, R.Christopher *et al.* A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. **Brain Research Reviews**, [s.l.], v. 25, n. 2, p. 192-216, Oct. 1997. Elsevier BV.

PINHEIRO, C.R. *et al.* Exposure to nicotine increases dopamine receptor content in the mesocorticolimbic pathway of rat dams and offspring during lactation. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 136, p. 87-101, Sept. 2015. Elsevier BV

PINHEIRO, C.R. *et al.* Maternal nicotine exposure during lactation alters food preference, anxiety-like behavior and the brain dopaminergic reward system in the adult rat offspring. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 149, p. 131-141, Oct. 2015. Elsevier BV



PINTO, Márcia Teixeira *et al.* Estimativa da carga do tabagismo no Brasil: mortalidade, morbidade e custos. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 31, n. 6, p. 1283-1297, June. 2015. FapUNIFESP (SciELO).

PORTES, Leonardo Henriques *et al.* A política de controle do tabaco no brasil: um balanço de 30 anos. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 23, n. 6, p.1837-1848, June 2018. FapUNIFESP (SciELO)

POST, R. M. ; CONTEL, N. R. Human and animal studies of cocaine: implications of development of behavioral pathology. *In*: Creese, I. (ed.). **Estimulantants: neurochemical, behavioral and clinical perspectives**. New York: Raven Press,1983. p. 169-203.

QUINN, Robert. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years?. **Nutrition**, [s.l.], v. 21, n. 6, p. 775-777, June 2005. Elsevier BV

REYNOLDS, Lawrence P. *et al.* Developmental programming of fetal growth and development. **Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice**, [s.l.], v. 35, n. 2, p. 229-247, July 2019. Elsevier BV

RICE, D *et al.* Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models.. **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 108, n. 3, p. 511-533, June 2000. Environmental Health Perspectives

ROBINSON, Terry. E. *et al.* Addiction. **Annual Review Of Psychology**, [s.l.], v. 54, n. 1, p. 25-53, Feb. 2003. Annual Reviews.

ROBINSON, Terry E. *et al.* Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brain Research Reviews**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 157-198, June 1986. Elsevier BV.

ROBINSON, Terry. E. *et al.* Incentive-sensitization and addiction. **Addiction**, [s.l.], v. 96, n. 1, p. 103-114, Jan. 2001. Wiley.

ROBINSON, Terry.E. *et al.* The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Research Reviews**, [s.l.], v. 18, n. 3, p. 247-291, Dec. 1993. Elsevier BV.

ROGUSKI, E.E. *et al.* Full-gestational exposure to nicotine and ethanol augments nicotine self-administration by altering ventral tegmental dopaminergic function due to NMDA receptors in adolescent rats. **J Neurochem**. v. 128, n. 5, p. 701-712, 2014.

ROMERO, Roland D. *et al.* Gender-related response in open-field activity following developmental nicotine exposure in rats. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 78, n. 4, p. 675-681, Aug. 2004. Elsevier BV.

ROSEMBERG, José; ROSEMBERG, Ana Margarida Arruda; MORAES, Marco Antônio. Nicotina: droga universal. In: **Nicotina: droga universal**. 2003.

ROWELL, Temperance R. *et al.* Will chronic e-cigarette use cause lung disease? **American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology**, [s.l.], v. 309, n. 12, p. 1398-1409, 15 Dec. 2015. American Physiological Society.

ROY, Tara Sankar *et al.* Prenatal nicotine exposure evokes alterations of cell structure in hippocampus and somatosensory cortex. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [s.l.], v. 300, n. 1, p. 124-133, 1 Jan. 2002. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET).

SANNA, P.P; BLOOM F.E. Neuroscience of addiction. **Neuron**, v. 21 p. 467– 1998.

SCHNEIDER, T. *et al.* Hyperactivity, increased nicotine consumption and impaired performance in the five-choice serial reaction time task in adolescent rats prenatally exposed to nicotine. **Psychopharmacology**, [s.l.], v. 223, n. 4, p. 401-415, May 2012. Springer Science and Business Media LLC

SCHOCHET, Terri L. *et al.* Differential behavioral effects of nicotine exposure in adolescent and adult rats. **Psychopharmacology**, [s.l.], v. 175, n. 3, p. 265-273, Apr. 2004. Springer Science and Business Media LLC

SHRAM, Megan J. *et al.* Acute nicotine enhances c-fos mRNA expression differentially in reward-related substrates of adolescent and adult rat brain. **Neuroscience Letters**, [s.l.], v. 418, n. 3, p. 286-291, May 2007. Elsevier BV.

SHEARMAN, E. *et al.* Nicotine-induced monoamine neurotransmitter changes in the brain of young rats. **Brain Research Bulletin**, [s.l.], v. 76, n. 6, p.626-639, Aug. 2008.

SILBEREIS, John C. *et al.* The cellular and molecular landscapes of the developing human central nervous system. **Neuron**, [s.l.], v. 89, n. 2, p.248-268, Jan. 2016. Elsevier

SILVA, Sandra Tavares da *et al.* Combate ao tabagismo no Brasil: a importância estratégica das ações governamentais. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.539-552, Feb. 2014. FapUNIFESP (SciELO).

SIMPSON, Sierra *et al.* Role of corticotropin-releasing factor in alcohol and nicotine addiction. **Brain Research**, [s.l.], v. 1740, p. 146850, Aug. 2020. Elsevier BV.

SLAWECKI, Craig J. *et al.* Increased CRF-like and NPY-like immunoreactivity in adult rats exposed to nicotine during adolescence: relation to anxiety-like and depressive-like behavior. **Neuropeptides**, [s.l.], v. 39, n. 4, p. 369-377, Aug. 2005. Elsevier BV.

SLOTKIN, Theodore A. *et al.* Effects of prenatal nicotine exposure on biochemical development of rat brain regions: maternal drug infusions via osmotic minipumps. **J Pharmacol Exp Ther.** 1987, 240:602- 611.

SLOTKIN, Theodore A. *et al.* Perinatal environmental tobacco smoke exposure in rhesus monkeys: critical periods and regional selectivity for effects on brain cell development and lipid peroxidation. **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 114, n. 1, p. 34-39, Jan. 2006. Environmental Health Perspectives

SLOTKIN, Theodore A. *et al.* Adolescent nicotine treatment changes the response of acetylcholine systems to subsequent nicotine administration in adulthood. **Brain Research Bulletin**, [s.l.], v. 76, n. 1-2, p.152-165, May 2008.

SMITH, Andrew M. *et al.* Early exposure to nicotine during critical periods of brain development: mechanisms and consequences. **Journal Of Pediatric Biochemistry**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 125-141, 2010. IOS Press

STEKETEE, Jeffery D. *et al.* Drug Wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. **Pharmacological Reviews**, [s.l.], v. 63, n. 2, p. 348-365, 13 abr. 2011. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET).

STELDINGER R, Luck W, Nau H. Half-lives of nicotine in milk of smoking mothers: implication for nursing [letter]. **J Perinat Med** 1988;16:261-2.

SÜDHOF, Thomas C. *et al.* Towards an understanding of synapse formation. **Neuron**, [s.l.], v. 100, n. 2, p. 276-293, Oct. 2018. Elsevier BV.

THIEL, Gerald. Synapsin I, Synapsin II, and Synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. **Brain Pathology**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 87-95, Jan. 1993. Wiley.

TORRES, Larissa Helena *et al.* Exposure of neonatal mice to tobacco smoke disturbs synaptic proteins and spatial learning and memory from late infancy to early adulthood. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 8, p. 1-21, 25 Aug. 2015. Public Library of Science (PLoS)

TORRES, Larissa Helena *et al.* Early postnatal tobacco smoke exposure triggers anxiety-like behavior and decreases synaptic proteins even after a long exposure-free period in mice. **Brain Research**, [s.l.], v. 1707, p. 99-106, Mar. 2019. Elsevier BV.

TORRES, Larissa Helena Lobo *et al.* Environmental tobacco smoke induces oxidative stress in distinct brain regions of infant mice. **Journal Of Toxicology And**

**Environmental Health, Part A**, [s.l.], v. 75, n. 16-17, p. 971-980, Aug. 2012. Informa UK Limited.

ULUSU, Umut *et al.* Evidence for the role of nitric oxide in nicotine-induced locomotor sensitization in mice. **Psychopharmacology**, [s.l.], v. 178, n. 4, p.500-504, 9 Oct. 2004. Springer Science and Business Media LLC.

U.S. National Cancer Institute and World Health Organization. The Economics of Tobacco and Tobacco Control. National Cancer Institute Tobacco Control Monograph 21. NIH Publication No. 16-CA-8029A. Bethesda, MD: U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute; and Geneva, CH: World Health Organization; 2016. Use and the Impact of Smoking Intensity. **Epidemiology**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.395

VEZINA, P. *et al.* Exposure to nicotine and sensitization of nicotine-induced behaviors. **Progress In Neuro-Psychopharmacology And Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 31, n. 8, p. 1625-1638, Nov. 2007. Elsevier BV.

VIGGIANO, Maurício Guilherme *et al.* Fumo e gravidez: repercussões sobre conceito e placenta. **J. Bras. Ginecol**, p. 147-152, 1990.

XIAO, Daliao *et al.* Antenatal nicotine induces heightened oxidative stress and vascular dysfunction in rat offspring. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 164, n. 5, p. 1400-1409, 11 Oct. 2011. Wiley

WAITES, Clarissa L. *et al.* Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. **Annual Review Of Neuroscience**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 251-274, 21 July 2005. Annual Reviews

WANDA, Germain Jean Magloire Ketcha *et al.* Anxiolytic and sedative activities of aqueous leaf extract of *Dichrocephala integrifolia* (Asteraceae) in mice. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 176, p. 494-498, Dec. 2015. Elsevier BV.

WANG, H. *et al.* Gestational nicotine exposure regulates expression of AMPA and NMDA receptors and their signaling apparatus in developing and adult rat hippocampus. **Neuroscience**, [s.l.], v. 188, p. 168-181, Aug. 2011. Elsevier BV.

WATTERSON, Elizabeth *et al.* Nicotine-induced behavioral sensitization in an adult rat model of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 312, p. 333-340, Oct. 2016. Elsevier BV.

WEST, Robert *et al.* Effect of oral nicotine dosing forms on cigarette withdrawal symptoms and craving: a systematic review. **Psychopharmacology**, [s.l.], v. 155, n. 2, p. 115-122, 28 Mar. 2001. Springer Science and Business Media LLC.

WEST, Robert. Tobacco smoking: health impact, prevalence, correlates and interventions. **Psychology & Health**, [s.l.], v. 32, n. 8, p. 1018-1036, May 2017. Informa UK Limited.

WICKSTROM, R. Effects of Nicotine During Pregnancy: Human and Experimental Evidence. **Current Neuropharmacology**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.213-222, Sept. 2007. Bentham Science Publishers Ltd

WORLD HEALTH ORGANIZATION . **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Geneva, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . **WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2000-2025**. Geneva,2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . **WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2015**. Geneva, 2015.



WORLD HEALTH ORGANIZATION . **The Economics of Tobacco and Tobacco Control**. Bethesda, 2016. National Cancer Institute Tobacco Control Monograph 21 NIH Publication No 16-CA-8029A

WORLD HEALTH ORGANIZATION . **Tobacco and its environmental impact: an overview**. Geneva, 2017.

ZHAO, Zhenping *et al*. E-cigarette use among adults in China: findings from repeated cross-sectional surveys in 2015:16 and 2018:19. **The Lancet Public Health**, [s.l.], v. 5, n. 12, p. 639-649, Dec. 2020. Elsevier BV.

ZHU, Jun *et al*. Distinct effects of enriched environment on dopamine clearance in nucleus accumbens shell and core following systemic nicotine administration. **Synapse**, [s.l.], v. 67, n. 2, p. 57-67, 8 Nov. 2012. Wiley.

## 11. ANEXO I

	<p><b>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO</b>  <b>Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG</b>          Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas/MG, CEP 37130-000          Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063</p>																			
<p><b>Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL</b></p>																				
<p><b>CERTIFICADO</b></p>																				
<p>Certificamos que a proposta intitulada "Exposição à nicotina durante os primeiros dias de vida pós-natal de camundongos, período crítico de desenvolvimento encefálico: efeitos na idade adulta com foco na sensibilização comportamental e no estresse", registrada com o nº 54/2018, sob a responsabilidade de Larissa Helena Lobo Torres Pacheco, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.</p>																				
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">Finalidade</th> <th style="width: 35%; text-align: center;">( ) Ensino</th> <th style="width: 35%; text-align: center;">(X) Pesquisa científica</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Vigência da autorização</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">De 01/12/2018 a 30/11/2021</td> </tr> <tr> <td>Espécie/linhagem/raça</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">Camundongo Swiss / heterogênico</td> </tr> <tr> <td>Nº de animais</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">60 (10 machos e 50 fêmeas)</td> </tr> <tr> <td>Sexo</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">Machos/Fêmeas</td> </tr> <tr> <td>Origem</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">Biotério Central da UNIFAL</td> </tr> </tbody> </table>			Finalidade	( ) Ensino	(X) Pesquisa científica	Vigência da autorização	De 01/12/2018 a 30/11/2021		Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico		Nº de animais	60 (10 machos e 50 fêmeas)		Sexo	Machos/Fêmeas		Origem	Biotério Central da UNIFAL	
Finalidade	( ) Ensino	(X) Pesquisa científica																		
Vigência da autorização	De 01/12/2018 a 30/11/2021																			
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico																			
Nº de animais	60 (10 machos e 50 fêmeas)																			
Sexo	Machos/Fêmeas																			
Origem	Biotério Central da UNIFAL																			
<p>Alfenas, 28 de Novembro de 2018.</p>																				
<p style="font-family: cursive; font-size: 1.2em;">Leonardo Almeida</p> <p>Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida          Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG</p>																				
<p><small>Scanned with CamScanner</small></p>																				