

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

**ANTONIO ALVES PEREIRA JÚNIOR**

**EXPOSIÇÃO À NICOTINA DURANTE O INÍCIO DO PERÍODO PÓS-NATAL:  
VULNERABILIDADE AO ESTRESSE NA VIDA ADULTA?**

**ALFENAS/MG**

**2021**

**ANTONIO ALVES PEREIRA JÚNIOR**

**EXPOSIÇÃO À NICOTINA DURANTE O INÍCIO DO PERÍODO PÓS-NATAL:  
VULNERABILIDADE AO ESTRESSE NA VIDA ADULTA?**

Dissertação 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<sup>a</sup>. 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  
Biblioteca Central – Campus Sede

Pereira Júnior, Antonio Alves

P436e Exposição à nicotina durante o início do período pós-natal: vulnerabilidade ao estresse na vida adulta? / Antonio Alves Pereira Júnior – Alfenas, MG, 2021.  
63 f.: il. –

Orientadora: Larissa Helena Lobo Torres Pacheco.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, 2021.

Bibliografia.

1. Tabagismo. 2. Redução de danos. 3. Amamentação. 4. Sistema nervoso central. 5. Fator neurotrófico derivado do cérebro. I. Pacheco, Larissa Helena Lobo Torres. II. Título.

CDD- 615

**ANTONIO ALVES PEREIRA JÚNIOR**

**EXPOSIÇÃO À NICOTINA DURANTE O INÍCIO DO PERÍODO PÓS-NATAL:  
VULNERABILIDADE AO ESTRESSE NA VIDA ADULTA?**

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

Aprovado em: 25 de fevereiro de 2021

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Helena Lobo Torres  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lívea Dornela Godoy  
Instituição: Universidade de São Paulo

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lisandra Brandino de Oliveira  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por [liveagodoy@alumni.usp.br](mailto:liveagodoy@alumni.usp.br), **Usuário Externo**, em 25/02/2021, às 10:58, 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 25/02/2021, às 10:59, 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 **Lisandra Brandino de Oliveira**, **Professor do Magistério Superior**, em 25/02/2021, às 11:01, 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 **0470307** e o código CRC **D4C2A157**.

Dedico este trabalho a minha família, que foi o fator determinante para meu sucesso. Em especial meus irmãos, meu pai, Antonio Alves Pereira e minha mãe, Mariléa das Dôres Machado Amaral, que me ofereceram o melhor e maior legado, que é a educação. Aos mestres, técnicos e demais funcionários da Unifal-MG que me possibilitaram estudar em uma Instituição pública, gratuita e de qualidade. A minha orientadora Larissa Helena Torres e ao meu coorientador Marcos Vinicius Salles Dias, imprescindíveis para a realização desta pesquisa.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.

Aos professores Marcos José Marques, Alexandre Giusti Paiva e a doutoranda Jádina Santos Vieira que gentilmente me instruíram e cederam seus laboratórios para a realização de parte dos nossos experimentos.

Aos professores Tania Marcourakis, Raphael Caio Tamborelli Garcia, Carla Speroni Ceron, Silvia Graciela Ruginsk Leitão, Henrique Dipe de Faria e Isarita Martins Sakakibara, que foram fundamentais para a realização desta pesquisa, colaborando com suas habilidades, competências e conhecimentos.

A toda equipe do Laboratório de Farmacologia Experimental e Clínica, em especial a Jéssyca Milene Ribeiro, Gabriel Estevam Santos de Amorim, Carolina Aparecida de Faria Almeida, Alessandra Oliveira Silva, Marilene Lopes Ângelo e as minhas alunas de iniciação científica Giovana de Cassia Pan e Maria Paula Souza Silva Alves, que me auxiliaram nos experimentos e foram companheiros em todos os momentos.

A minha orientadora Larissa Helena Torres por ter me aceitado como orientando, por todos os ensinamentos e orientações, pela confiança em mim depositada e pelo companheirismo durante toda esta jornada, sendo uma inspiração como cientista.

Ao meu coorientador Marcos Vinicios Salles Dias pelo acolhimento e por toda a ajuda oferecida e conhecimentos repassados durante a realização deste trabalho.

*"Há muitas maneiras de ver o cérebro,  
como há muitas maneiras de ver o mundo."*

Roberto Lent, 2010.

## RESUMO

O tabagismo é um problema de saúde pública e atinge cerca de um terço da população adulta do mundo, sendo considerado a principal causa evitável de doenças e mortes prematuras. A quantidade de nicotina encontrada no leite de mulheres tabagistas pode chegar ao triplo da quantidade sérica, mesmo assim a Academia Americana de Pediatria não inclui a nicotina na lista de drogas contraindicadas durante a lactação devido à falta de evidências científicas na área. Este trabalho teve como objetivo avaliar se a exposição de nicotina durante o início do período pós-natal em roedores fêmeas induz maior vulnerabilidade ao estresse na vida adulta. Para isso, camundongos Swiss fêmeas foram expostos à nicotina (8 mg/kg/dia) durante a fase de amamentação, entre os dias pós-natal 4 (PN4) e PN17, através de minibombas osmóticas implantadas nas mães. O grupo controle recebeu uma minibomba contendo salina 0,9%. Na idade adulta (PN65), foi realizado o protocolo de estresse crônico imprevisível por 10 dias, tendo o teste de nado forçado (NF) como um dos estressores. Um dia após o último estressor, foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado (LCE) e em seguida, os animais foram eutanasiados, o sangue coletado para quantificação de corticosterona e as estruturas encefálicas separadas para quantificação do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), e das proteínas sinápticas PSD-95, sinaptofisina e sinapsina I. Não houve alteração da corticosterona sérica em nenhum dos grupos. O protocolo de estresse promoveu uma diminuição no peso corporal e, no LCE, houve um aumento da velocidade média dos camundongos. Nos animais expostos à nicotina e ao protocolo de estresse houve um aumento das frequências de *grooming* e *head dipping*. Adicionalmente, os animais expostos à nicotina tiveram um aumento da latência para imobilidade e uma diminuição no tempo imóvel no NF, além de uma redução dos níveis de BDNF no cerebelo. Nos animais expostos à nicotina e/ou ao estresse, houve uma diminuição de BDNF no estriado e de PSD-95 e sinapsina I no tronco encefálico. Os grupos expostos isoladamente ao estresse ou à nicotina tiveram um aumento de PSD-95, sinaptofisina e sinapsina I no cerebelo.

Palavras-chave: Tabagismo; Redução de danos; Amamentação; Sistema nervoso Central; Fator neurotrófico derivado do cérebro.

## ABSTRACT

Smoking is a public health problem and affects about one-third of the world's adult population, being considered the main preventable cause of diseases and premature deaths. The amount of nicotine found in women who smoke can reach triple the amount of serum, but the American Academy of Pediatrics does not include nicotine in the list of contraindicated drugs during lactation due to the lack of scientific evidence in the area. This study aimed to assess whether nicotine exposure during the early postnatal period in rodents due to greater vulnerability to stress in adulthood. For that, Swiss mice were exposed to nicotine (8 mg / kg / day) during the breastfeeding phase, between the postnatal days 4 (PN4) and PN17, through osmotic minipumps implanted in the mothers. The control group integrated a minipump containing 0.9% saline. In adulthood (PN65), the unpredictable chronic stress protocol was performed for 10 days, with the forced swimming test as one of the stressors. One day after the last stressor, the elevated plus-maze test was performed and then the animals were euthanized, the blood collected for quantification of corticosterone and the separate brain structures for quantification of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), PSD-95, synaptophysin, and synapsin I. There was no change in serum corticosterone in any of the groups. The stress protocol promoted a decrease in the body weight of the mice and, in the elevated plus-maze test, an increase in the average speed. In animals exposed to nicotine and the stress protocol, there was an increase in grooming frequencies and head diving. Animals exposed to nicotine had an increased latency for immobility and a decrease in immobile time in the forced swimming test, and a reduction in BDNF levels in the cerebellum. In animals exposed to nicotine and/or stress, there was a decrease in BDNF in the striatum and PSD-95 and synapsin I in the brainstem. Groups exposed to stress or nicotine alone had an increase in PSD-95, synaptophysin, and synapsin I in the cerebellum.

Keywords: Smoking; Harm reduction; Breast-feeding; Central nervous system; Neurotrophic factor derived from the brain.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema representativo dos níveis de cortisol em cada fase da síndrome geral da adaptação.....	21
Figura 2 -	Desenho experimental do presente estudo.....	25
Figura 3 -	Corticosterona sérica dos camundongos Swiss fêmeas submetidas ou não ao protocolo de estresse crônico imprevisível ....	32
Figura 4 -	Parâmetros comportamentais do LCE dos camundongos Swiss fêmeas submetidas ou não ao protocolo de estresse crônico imprevisível .....	33
Figura 5 -	Imagens representativas das membranas de padronização do ensaio de Western blot .....	34
Figura 6 -	Corticosterona sérica de camundongos expostos à salina ou nicotina e foram submetidos ou não a um protocolo de estresse crônico .....	35
Figura 7 -	Evolução ponderal dos camundongos Swiss fêmeas nos diferentes grupos experimentais entre P25 e P75. ....	36
Figura 8 -	Labirinto em cruz elevado .....	37
Figura 9 -	Nado forçado.....	39
Figura 10 -	BDNF no cerebelo, tronco encefálico, hipocampo e estriado. ....	41
Figura 11 -	PSD-95 no tronco encefálico, hipocampo, cerebelo e no corpo estriado por meio de ensaio de Western blot. ....	43
Figura 12 -	Sinaptofisina no tronco encefálico, hipocampo, cerebelo e no corpo estriado por meio de ensaio de Western blot. ....	45
Figura 13 -	Sinapsina I no tronco encefálico, hipocampo, cerebelo e no corpo estriado por meio de ensaio de Western blot. ....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência do procedimento de estresse crônico variável.....	27
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BDNF</b>	- Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>LCE</b>	- Labirinto em cruz elevado
<b>NF</b>	- Nado forçado
<b>OMS</b>	- Organização mundial da saúde
<b>PN</b>	- Dia pós-natal
<b>PSD-95</b>	- Proteína pós-sináptica de densidade 95
<b>SNC</b>	- Sistema nervoso central
<b>TBS</b>	- Solução salina tamponada com Tris

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1</b>	<b>Histórico e epidemiologia do tabagismo</b> .....	16
2.1.1	O tabagismo em mulheres e grávidas.....	17
2.1.2	Cessaç�o do tabagismo e redução de danos .....	19
<b>2.2</b>	<b>Nicotina</b> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Estresse</b> .....	20
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>5</b>	<b>MATERIAL E METODOS</b> .....	24
<b>5.1</b>	<b>Animais</b> .....	24
<b>5.2</b>	<b>Desenho experimental</b> .....	24
<b>5.3</b>	<b>Nicotina</b> .....	26
<b>5.4</b>	<b>Implantaç�o da minibomba de pressão osmotica</b> .....	26
<b>5.5</b>	<b>Protocolo de estresse cronico variável</b> .....	26
<b>5.6</b>	<b>Avaliação comportamental</b> .....	27
5.6.1	Nado Forçado .....	28
5.6.2	Labirinto em cruz elevado .....	28
<b>5.7</b>	<b>Eutanasia, coleta de sangue e dissecação</b> .....	28
<b>5.8</b>	<b>Quantificação de corticosterona</b> .....	29
<b>5.9</b>	<b>Western blot</b> .....	29
<b>5.10</b>	<b>Quantificação do BDNF</b> .....	30
<b>5.11</b>	<b>Analises estatsticas</b> .....	31
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	32
<b>6.1</b>	<b>Padronização do protocolo de estresse cronico</b> .....	32
6.1.1	Dosagem e corticosterona serica.....	32
6.1.2	Labirinto em cruz elevado .....	33
6.1.3	Padronização do ensaio de Western Blot .....	34
<b>6.2</b>	<b>Avaliação da vulnerabilidade ao estresse na vida adulta após exposição à nicotina no início da fase pós-natal</b> .....	35
6.2.1	Dosagem de corticosterona sérica.....	35

6.2.2	Evolução ponderal .....	35
6.2.3	Labirinto em cruz elevado .....	36
6.2.4	Nado forçado.....	38
6.2.5	Quantificação de BDNF .....	40
6.2.6	Quantificação de PSD-95, sinaptofisina e sinapsina I por Western blot....	42
6.2.6.1	<i>PSD-95</i> .....	42
6.2.6.2	<i>Sinaptofisina</i> .....	44
6.2.6.3	Sinapsina I .....	46
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tabagismo atinge cerca de um terço da população adulta do mundo, sendo responsável direto por milhões de mortes anuais e é considerado a principal causa evitável de doenças e mortes prematuras. Desde a sua popularização mundial, o tabagismo vem sendo controlado por ações decorrentes de acordos e propostas realizadas por órgãos de saúde devido aos fatores negativos decorrentes deste hábito como diversos tipos de câncer e doenças pulmonares e cardíacas crônicas (ACHUTTI; MENEZES, 2001; MUAKAD, 2014).

Somente nas últimas décadas surgiram as primeiras pesquisas avaliando os efeitos do tabagismo considerando as diferenças morfológicas e fisiológicas entre os sexos, sendo que os estudos anteriores eram estritamente direcionados para a população masculina, mesmo as mulheres sendo um dos principais grupos atingidos pelos problemas decorrentes do tabagismo e pela exposição à fumaça de forma passiva (SAMET; YOON, 2001).

O tabagismo durante a gravidez possui relação direta com a implantação ectópica e aumento da morbidade e mortalidade perinatal. Quase metade das mulheres mantém o consumo do tabaco durante a gravidez, sendo influenciadas pela dependência e pelo medo de ganho de peso durante a gestação. Das mulheres que abandonam o tabagismo durante o período gestacional, aproximadamente 75% retomam o tabagismo ainda durante o período de amamentação (LUMLEY, 2009).

Há no mercado diversas alternativas para redução de danos no consumo de tabaco, incluindo o cigarro eletrônico, gomas de mascar ou adesivos transdérmicos de nicotina (IRHA, 2010). Estas alternativas, comumente referidos como produtos de exposição potencialmente reduzida, nem sempre podem apresentar o efeito terapêutico desejado, já que muitos fumantes continuam a fumar o cigarro tradicional ou relatam que os cigarros eletrônicos não são uma alternativa satisfatória ao tabagismo, sendo que a exposição reduzida pode não se traduzir necessariamente em risco reduzido para o usuário individual ou para pessoas expostas, além dos efeitos do uso em longo prazo não serem bem conhecidos (COX *et al.*, 2018; PECHACEK *et al.*, 2016; TATARSKY, 2003).

Dados epidemiológicos indicam que os estressores facilitam o início do tabagismo, diminuem a motivação para parar e aumentam o risco de recaída. Além disso, pessoas com depressão ou transtorno de ansiedade têm maior probabilidade

de fumar do que pessoas sem esses transtornos (HUGHES; KEELY; NAUD, 2004; JARVIS, 2004; NIAURA, 2001). A nicotina e o estresse compartilham mecanismos moduladores no sistema nervoso central (SNC). Camundongos submetidos a estresse agudo ou expostos a nicotina tem um aumento na intensidade das sinapses excitatórias dos neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo (SAAL *et al.*, 2003). A exposição à nicotina aumenta a sensibilidade ao estresse por uma remodelação dos sistemas nicotínicos, causando, o aumento de comportamentos relacionados ao estresse, como a aversão social em camundongos (MOREL *et al.*, 2018). Ainda, trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram que a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal está relacionada com prejuízo no desenvolvimento encefálico de roedores, interferindo no aprendizado e memória, além de reduzir o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e proteínas sinápticas (TORRES *et al.*, 2015).

Neste contexto, este projeto de pesquisa tem como foco avaliar se a exposição à nicotina durante o início do período pós-natal leva a maior vulnerabilidade ao estresse na vida adulta em camundongos fêmeas. Para isto, as mães foram implantadas com minibombas de pressão osmótica contendo 200 µL de nicotina solubilizada em salina na concentração de 56 mg/mL, sendo liberada uma dose diária de 8 mg de nicotina para cada kg de animal. Na fase adulta, os animais passaram por um protocolo de estresse crônico imprevisível e em seguida foram avaliados os parâmetros bioquímicos e comportamentais relacionados ao estresse. Para os estudos comportamentais foram utilizados os testes de labirinto em cruz elevado e nado forçado, que avaliam ansiedade e depressão. Foi também avaliado a concentração de BDNF por meio de imunoenensaio e proteínas sinápticas – PSD-95, sinaptofisina e sinapsina I – por meio de *western blot*.

Este trabalho possui relevância para a comunidade científica já que a exposição à xenobióticos em uma fase crítica de maturação do SNC está relacionada à prejuízo ao processo de desenvolvimento. Cabe ainda destacar que a concentração de nicotina encontrada no leite de mães fumantes é quase o triplo da sua concentração sérica. Além disso são escassos os estudos avaliando a exposição à nicotina na fase de amamentação (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2001).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Histórico e epidemiologia do tabagismo

O tabaco é um produto originado do processamento das folhas de plantas do gênero *Nicotiana*, em especial a *Nicotiana tabacum*, que é de origem sul-americana e teve suas sementes enviadas do Brasil para a França no ano de 1560 pelo médico e embaixador Jean Nicot, popularizando o consumo do tabaco no continente europeu e espalhando rapidamente para todo o mundo em uma velocidade nunca antes observada em nenhum outro hábito social ou droga (ROSEMBERG; ROSEMBERG; MORAES, 2003).

Desde a antiguidade o consumo do tabaco é realizado por diversas formas, inicialmente manipulado por tribos indígenas como inseticida e em rituais religiosos nas formas de cachimbos e charutos. Atualmente, aproximadamente 90% do consumo mundial de tabaco é realizado por meio de cigarros, sendo a forma de utilização mais popular desde o século XIX (MUAKAD, 2014).

A partir da década de 60, foram desenvolvidos os primeiros estudos indicando os efeitos negativos na saúde e correlacionando doenças com o uso do tabaco. Aproximadamente 50 doenças diferentes são descritas como consequência do hábito de fumar, incluindo diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares e pulmonares crônicas (GOODCHILD; NARGIS; D'ESPAIGNET, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera o tabagismo a maior causa de morte evitável em todo o mundo, estimando que aproximadamente 1,2 bilhão de pessoas em todo o mundo são fumantes, dentre elas, 250 milhões são mulheres. É estimada a morte anual de 7 milhões de pessoas em todo o mundo devido ao tabagismo, em sua maioria nos países em desenvolvimento (WHO, 2018). No Brasil, o tabagismo é responsável por aproximadamente 200 mil mortes por ano, sendo responsável também por mais de 26 mil casos de câncer de pulmão (NUNES; CASTRO, 2010).

Além de danos à saúde, o tabagismo interfere diretamente na economia. No ano de 2015 foram gastos aproximadamente 56,9 bilhões de reais no Brasil em despesas médicas ou por perda de produtividade relacionados ao uso do tabaco, sendo que a arrecadação de impostos no país sobre a venda de cigarros abrange apenas 23% das despesas geradas pelo tabagismo (PINTO *et al.*, 2017).

Diante da relevância do assunto, a OMS estabeleceu acordos e propostas para o controle do tabagismo, empenhando organizações governamentais e privadas a desenvolverem políticas de saúde visando uma diminuição dos índices de fumantes em todo o mundo (REITSMA *et al.*, 2017).

A Pesquisa Nacional de Saúde indica que a prevalência do tabagismo tem diminuído no Brasil com o passar dos anos. Em 1989 a taxa de fumantes maiores de 18 anos era de 34,8%. Em 2003 a taxa foi de 22,4% e em 2008, 18,5%. Mais recentemente, em 2013, a taxa de fumantes na população adulta foi de 14,3%, sendo 11% das mulheres e 18,9% dos homens de todo o Brasil (IBGE, 2014). O controle do tabagismo no Brasil foi efetivo nas últimas décadas, mas ainda há um maior aumento da prevalência de fumantes entre mulheres jovens quando comparado a homens da mesma idade (MENEZES *et al.*, 2008).

O tabagismo passivo também é um grave problema de saúde pública, sendo estimada a exposição de 40% das crianças, 35% das mulheres e 33% dos homens à fumaça do tabaco, ocasionando a morte anual de 603 mil pessoas em todo o mundo, dentre estes, 48% mulheres e 28% crianças menores de 5 anos (ÖBERG *et al.*, 2011).

### 2.1.1 O tabagismo em mulheres e grávidas

No último século, a maioria dos estudos sobre dependência de nicotina foram voltados para a população masculina tendo como justificativa as possíveis interferências nos resultados gerados pelos efeitos hormonais relacionados ao ciclo menstrual e gravidez. Recentemente houve um aumento no número de pesquisas que consideram os diferentes aspectos morfológicos e fisiológicos entre os sexos, possibilitando uma avaliação inicial das diferenças em relação às características da dependência pela nicotina entre homens e mulheres (SAMET; YOON, 2001).

Estudos sugerem que a população feminina tem mais dificuldades de cessar o tabagismo devido a relação do hábito de fumar das mulheres com o humor e ao reforço negativo (BENOWITZ, 2008), possuindo também uma metabolização mais rápida da nicotina em relação aos homens. Há evidências de uma maior metabolização da nicotina no organismo durante a fase lútea do ciclo menstrual, podendo gerar uma maior dificuldade para cessar o consumo (BENOWITZ, 2006).

As mulheres apresentam uma maior chance de desenvolver câncer de pulmão relacionado ao uso de cigarros, pois a nicotina induz na população feminina uma maior concentração do receptor do peptídeo liberador de gastrina, atuando como fator de crescimento tumoral, além de produzirem uma maior quantidade de nitrosaminas em comparação aos homens (BENOWITZ, 2008). O tabagismo influencia o carcinoma de colo uterino, triplicando o risco deste tipo de câncer (KJELLBERG *et al.*, 2000). Estudos também relacionam o tabagismo com o aumento do risco de cânceres de vulva (MADSEN *et al.*, 2008), mama (JONES *et al.*, 2017) e ovário (KISPERT; MCHOWAT, 2017).

A utilização do tabaco aumenta a metabolização dos anticoncepcionais orais, podendo desencadear quadros de trombose devido à diminuição dos níveis séricos hormonais. O tabagismo duplica o risco de gravidez ectópica, interferindo nas funções das tubas e ovários (REICHERT *et al.*, 2009) e pode induzir menopausa precoce nas mulheres, antecipando o quadro clínico em até três anos (WHITCOMB *et al.*, 2017).

Nos Estados Unidos, 40% das mulheres que fumam interrompem o consumo de cigarros durante a gravidez, mas apenas 25% das fumantes permanecem abstinentes ao longo de um ano, retomando o consumo ainda durante a gestação ou no período de amamentação. Estudos também mostram que o uso de cigarros na gestação está associado ao medo de ganho de peso (LUMLEY, 2009). O tabagismo durante a gravidez está diretamente relacionado com o aumento da morbidade e mortalidade perinatal (PATTINSON; TAYLOR; PATTINSON, 1991), podendo desenvolver diversas complicações fetais, como o aborto espontâneo, nascimento prematuro, baixo peso ao nascer, distúrbios ventilatórios, entre outros (GILLILAND; LI; PETERS, 2001 e ROZOV *et al.*, 2004).

A quantidade de nicotina encontrada no leite de mulheres tabagistas pode chegar ao triplo da quantidade sérica, mas a Academia Americana de Pediatria não inclui a nicotina na lista de drogas contraindicadas durante a lactação devido à falta de evidências científicas na área. Formas alternativas de administrar a nicotina, como a transdérmica e oral, são utilizadas durante o período de cessação do tabagismo como forma de inibir o consumo de cigarros, entretanto, não foram suficientemente estudadas para avaliar se a utilização destes métodos durante a lactação é eficiente e quais seriam os efeitos em longo prazo (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2001).

### 2.1.2 Cessação do tabagismo e redução de danos

A redução de danos pode ser determinada como ação que tende a diminuir as interferências em todos os espectros provocados pelo uso de drogas, sem haver necessariamente uma diminuição do consumo. Há diversas alternativas para redução de danos no consumo de tabaco, dentre eles estão o ato de mascar ou aspirar outros derivados do tabaco sem combustão e as terapias de reposição de nicotina por vias transdérmica ou nasal (IRHA, 2010).

O cigarro eletrônico foi uma das mais recentes propostas como redução de danos no tabagismo. Por não realizar a combustão como no cigarro tradicional, o dispositivo libera vapor de nicotina sem a presença da maioria dos compostos maléficos presentes na fumaça do cigarro (FARSALINOS; HOUEZEC, 2015). Os efeitos do uso a longo prazo dos cigarros eletrônicos ainda não são conhecidos, mas devido à não-regulamentação, os equipamentos podem funcionar de maneiras bastante distintas de acordo com o modelo. Em alguns casos, o dispositivo pode produzir apenas traços de algumas substâncias tóxicas ou liberar níveis de agentes tóxicos e carcinogênicos mais elevados que encontrados em cigarros combustíveis (POLOSA *et al.*, 2013).

Essas ações que visam a cessação do tabagismo, podem inicialmente, reduzir os danos provocados pelo tabaco, mas ao diminuir a administração de nicotina são desencadeados comportamentos compensatórios, induzindo um maior consumo dessa substância (TATARSKY, 2003).

## 2.2 Nicotina

A nicotina é um alcaloide vegetal e foi isolada na planta do tabaco pela primeira vez em 1828 pelos químicos alemães Posselt e Reimann, e posteriormente foi amplamente estudada pelo toxicologista Orfila, a partir de 1843. É também encontrada em pequenas quantidades em plantas como o tomate, batata, pimenta verde e berinjela (HENNINGFIELD; ZELLER, 2006; POSSELT; REIMANN, 1828).

A nicotina é o composto de maior relevância presente no cigarro, agindo como agonista dos receptores colinérgicos nicotínicos de acetilcolina, estimulando o SNC a liberar hormônios e neurotransmissores, dentre eles o hormônio

adrenocorticotrófico (ACTH), beta-endorfina, noradrenalina, serotonina e dopamina. Em baixas doses de nicotina há estimulação ganglionar e em altas doses o bloqueio deste mecanismo (BENOWITZ, 2009).

Durante o desenvolvimento do SNC a exposição à nicotina induz teratogênese na fase de neurulação, podendo gerar anomalias no tubo neural. Também diminui a quantidade de neurônios e causa danos celulares mais intensos nos segundo e terceiro trimestres de gestação, podendo induzir hipoatividade colinérgica, déficit de noradrenalina e dopamina. A exposição perinatal à nicotina é relacionada com alterações comportamentais, psicomotoras e sexuais em jovens (LEOPÉRCIO; GIGLIOTTI, 2004). O nível sérico de cotinina, metabólito da nicotina, em crianças expostas à fumaça do cigarro tem relação com o desenvolvimento de sintomas do transtorno de ansiedade, depressão e déficit de atenção (BANDIERA *et al.*, 2011).

Estudos prévios já publicados pelo nosso grupo mostram que a exposição de camundongos à fumaça do cigarro durante o início do período pós-natal tem efeitos negativos na memória e aprendizagem espacial, além de diminuir a concentração do BDNF e de proteínas sinápticas, dentre elas a sinapsina, sinaptofisina e PSD-95 (TORRES *et al.*, 2015). O BDNF é importante para o desenvolvimento do SNC e para a regulação da sobrevivência celular. Já as proteínas sinápticas são importantes reguladores da neurotransmissão (TANG; MACHAALANI; WATERS, 2008).

### **2.3 Estresse**

Estresse foi definido pelo médico canadense Hans Selye, pioneiro nos estudos desta área, como um elemento intrínseco a toda doença, produzindo modificações inespecíficas na estrutura e na composição do organismo, as quais podem ser observadas e mensuradas. Estas situações não são controladas, tornando-as exaustivas e perigosas para o organismo (SELYE, 1978). Em situações de estresse há a ativação do sistema nervoso autônomo e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal como resposta fisiológica a adversidades. A ativação excessiva das funções adrenocortical e autonômica são prejudiciais ao organismo e ocorre quando há preocupação antecipada ou lembrança de um momento estressante, sendo

observadas repostas fisiológicas ao estresse mesmo na ausência do agente estressor (ENGELMANN; LANDGRAF; WOTJAC, 2004).

De acordo com os estudos de Selye, o estresse é um elemento relacionado com as modificações inespecíficas do organismo, se manifestando pela Síndrome Geral da Adaptação que se desenvolve em três etapas (Figura 1). A primeira fase é a de alarme, sendo a resposta inicial à uma lesão ou estressor, sendo caracterizada por manifestações agudas que desaparecem na fase de resistência e retomam na fase de esgotamento ou exaustão (SELYE, 1978).

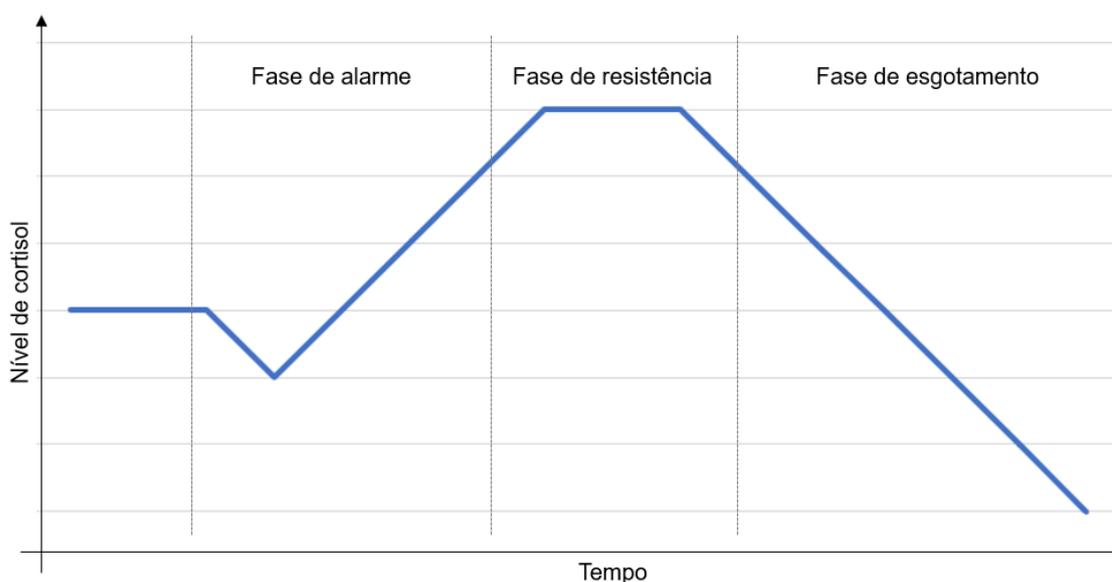


Figura 1 – Esquema representativo dos níveis de cortisol em cada fase da Síndrome Geral da Adaptação descrita por Selye.

Fonte: Adaptado de SELYE, Hans. *The Stress of Life*: Rev Ed. McGraw-Hill, 1978.

Estudos indicam o estresse como um fator de predisposição ao uso de drogas de abuso, podendo desencadear a recaída ao uso do tabaco, já que após a exposição a eventos estressantes há um aumento do desejo de fumar. Foi observada uma sensibilização cruzada entre estresse crônico imprevisível e exposição à nicotina em ratos, havendo uma maior locomoção em campo aberto na interação destes dois fatores (CEZÁRIO *et al.*, 2012). Estudos prévios indicam que o estresse crônico reduz a concentração de BDNF no hipocampo (MURAKAMI, *et al.*, 2005), modifica a plasticidade sináptica e induz alterações específicas na concentração da pró-dinorfina, c-Fos, sinapsina, sinaptofisina e PSD-95 (DAGYTE, *et al.*, 2011; THOME, *et al.* 2001; YU, *et al.*, 2016).

### 3 JUSTIFICATIVA

A OMS estima que o mundo tenha 1,2 bilhão de fumantes, havendo a morte anual de 7 milhões de pessoas em decorrência do tabagismo (WHO, 2018). As crianças e mulheres são as maiores vítimas do fumo passivo, contudo, a grande maioria dos estudos sobre os efeitos do tabaco e da nicotina tem como foco o sexo masculino (SAMET; YOON, 2001). A política de redução de danos é uma estratégia interessante no combate ao tabagismo e diversos produtos são comercializados com esta finalidade como cigarros eletrônicos, adesivos e gomas de reposição de nicotina. No entanto, não há estudos suficientes sobre o efeito a longo prazo do uso de tais produtos, especialmente se houver exposição em uma fase crítica de desenvolvimento do SNC, como acontece no período de amamentação (TATARSKY, 2003). De fato, a Academia Americana de Pediatria indica que não há estudos suficientes para avaliar se a exposição à nicotina no período de lactação é ou não nociva para a criança (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2001).

O estresse é relacionado como fator de predisposição ao uso de drogas, desencadeando recaída ao uso do tabaco e aumentando o desejo de fumar (CEZÁRIO *et al.*, 2012). Neste contexto, este trabalho teve com finalidade, avaliar parâmetros comportamentais e bioquímicos em camundongos fêmeas expostas a estresse crônico imprevisível na fase adulta e que foram expostas à nicotina na fase de amamentação, produzindo aporte científico para avaliar os riscos da nicotina a longo prazo na vida do indivíduo.

## 4 OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto é avaliar os parâmetros comportamentais e bioquímicos em camundongos fêmeas, que foram expostas à nicotina na fase de amamentação, submetidas ao estresse crônico imprevisível na fase adulta.

### **Estratégia experimentais:**

Utilizando camundongos fêmeas adultas, expostas ou não à nicotina durante a fase de amamentação, avaliar:

- a) Evolução ponderal e ensaios comportamentais (labirinto em cruz elevado e nado forçado);
- b) Concentração de corticosterona sérica;
- c) Concentração de BDNF no hipocampo, estriado, tronco encefálico e cerebelo;
- d) Concentração das proteínas PSD-95, sinaptofisina e sinapsina no hipocampo, estriado cerebelo e tronco encefálico.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Animais

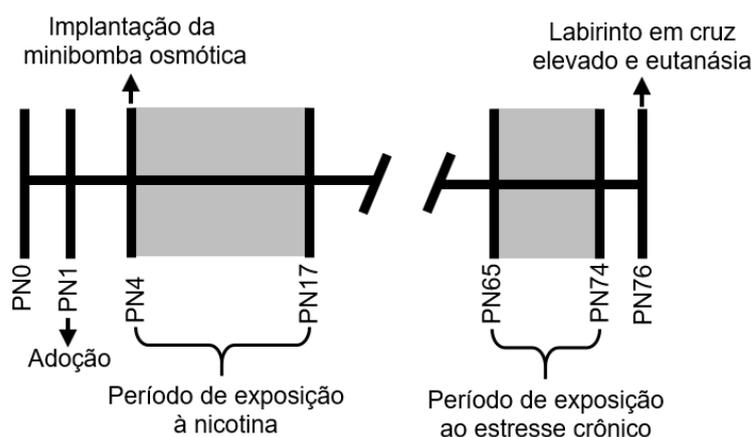
Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* oriundas de ninhadas de cruzamentos de camundongos provenientes do biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos juntamente com as mães em caixas de polietileno durante a fase de lactação, com livre acesso à água e comida (ração para roedores Nuvilab CR1<sup>®</sup>), a temperatura do ambiente foi controlada ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de doze horas (luz ligada às 7h da manhã). O presente projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética desta instituição (54/2018).

### 5.2 Desenho experimental

Para avaliar os efeitos da exposição à nicotina durante o início do período pós-natal, inicialmente foi necessário realizar a reprodução dos roedores. Camundongos de 6 a 8 semanas de idade foram colocados juntos durante 5 dias para acasalamento, adicionando em cada caixa duas fêmeas e um macho. Após o período de acasalamento, as fêmeas prenhas foram separadas e mantidas assim até o nascimento da prole. Um dia após o nascimento dos filhotes, foi realizada a adoção, padronizando as ninhadas alocando 8 filhotes para cada mãe (4 machos e 4 fêmeas). Cabe destacar que os filhotes machos foram utilizados em outro projeto de pesquisa do laboratório. Como observado na Figura 2, as fêmeas foram submetidas à implantação da minibomba osmótica contendo 200  $\mu\text{L}$  da solução de nicotina (56 mg/ml) ou salina 0,9% estéril no quarto dia pós-natal (PN4) e colocadas na caixa para a amamentação dos filhotes até o 17<sup>o</sup> de vida, quando a minibomba foi retirada cirurgicamente.

Os animais foram pesados em todas as idades para a avaliação ponderal e o protocolo de exposição ao estresse crônico foi realizado durante 10 dias consecutivos na fase adulta dos filhotes, iniciando em P65 e sendo finalizado em P74; sendo que em P68, P71 e P74 foi realizado o nado forçado, funcionando como estressor e teste comportamental. O nado forçado nos grupos não expostos ao

estresse foi realizado apenas uma vez, em P68. No dia P76 foram realizados os testes de LCE e logo após os animais foram eutanasiados por decapitação para a coleta das estruturas encefálicas e do sangue. Os grupos não expostos ao estresse crônico imprevisível não foram perturbados, exceto para pesagem, limpeza da gaiola e reposição de água e comida até o dia de realização dos testes comportamentais.



**Figura 2** - Desenho experimental do presente estudo.

Nota: No primeiro dia pós-natal (PN1) os filhotes foram realocados em 8 por ninhada, sendo 4 de cada sexo. Em P4 foi realizada a implantação da minibomba de pressão osmótica nas mães de cada ninhada, contendo 200  $\mu$ L da solução de nicotina (56 mg/mL) ou 200  $\mu$ L de salina 0,9% estéril. A minibomba libera uma dose diária de 8 mg/kg de nicotina durante 14 dias (P4 a P17). Em PN22 os animais foram desmamados e separados por sexo, sendo as fêmeas utilizadas no presente projeto. Na fase adulta, em um período de 10 dias (P65-P74), foi realizado o protocolo de estresse crônico imprevisível, expondo dois grupos a situações estressantes. Os controles foram manejados apenas para a limpeza da gaiola e pesagem. Em PN74 - teste de nado forçado. PN75 - LCE e em seguida os animais foram eutanasiados para a coleta das estruturas encefálicas e do sangue.

Fonte: Do autor (2021).

Assim, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, conforme descrito a seguir:

- a) Grupo SAL/NE (n=14): animais que foram amamentados pela mãe que teve implantada a minibomba contendo apenas salina e não foram expostos ao estresse crônico na fase adulta.
- b) Grupo SAL/E (n=14): animais que foram amamentados pela mãe que teve implantada a minibomba contendo apenas salina e foram expostos ao estresse crônico na fase adulta.
- c) Grupo NIC/NE (n=14): animais que foram amamentados pela mãe que teve implantada a minibomba contendo nicotina e não foram expostos ao estresse crônico na fase adulta.

- d) Grupo NIC/E (n=14): animais que foram amamentados pela mãe que teve implantada a minibomba contendo nicotina e foram expostos ao estresse crônico na fase adulta.

### **5.3 Nicotina**

A nicotina (Nicotine di-tartrate salt - Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA) foi diluída em salina 0,9% estéril e administrada nas mães de cada ninhada por meio da implantação subcutânea da minibomba de pressão osmótica durante 14 dias na dose de diária de 8 mg/kg de nicotina sendo repassada para os filhotes durante este período por meio da amamentação.

### **5.4 Implantação da minibomba de pressão osmótica**

Minibombas de pressão osmótica (ALZET® modelo 2002 de 200 µL) foram implantadas no tecido subcutâneo nas mães de cada ninhada. Como medida profilática, na noite anterior à cirurgia foi administrado por meio de gavagem amoxicilina na dose de 22 mg/kg e uma hora antes da cirurgia, foi administrado intraperitonealmente meloxicam na dose 2 mg/kg, com objetivo de evitar inflamação e infecções pós-operatórias. Após anestesia por via intraperitoneal com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), foi retirada a pelugem e realizada uma incisão de 1 cm abaixo da região dorsal do pescoço, inserindo a minibomba contendo salina ou a solução de nicotina sob a pele e suturando em seguida. Por fim, o camundongo foi colocado em bolsa térmica aquecida até reestabelecimento da consciência (SIMONS *et al.*, 2005).

### **5.5 Protocolo de estresse crônico variável**

O protocolo do estresse crônico variável foi adaptado de Ortiz e colaboradores (1996) e consiste na exposição dos roedores a diferentes estressores de forma imprevisível em horários variáveis, como descrito na Tabela 1. Dentre os

procedimentos estão o isolamento, serragem úmida, imobilização, privação de água e comida, natação forçada e inversão do ciclo de luz.

Tabela 1 – Sequência do procedimento de estresse crônico variável.

<b>Dia</b>	<b>Horário</b>	<b>Procedimento</b>	<b>Duração</b>	<b>Horário</b>	<b>Procedimento</b>	<b>Duração</b>
1	10h00	Imobilização	1h	18h00	Serragem úmida	<i>Overnight</i>
2	15h00	Isolamento no frio	1h	19h00	Luzes acesas	<i>Overnight</i>
3	8h00	Serragem úmida	10h	19h00	Privação de água e comida	<i>Overnight</i>
4	12h00	Luzes apagadas	3h	15h00	Nado forçado	6min
5	7h00	Serragem úmida	12h	19h00	Isolamento	<i>Overnight</i>
6	14h00	Isolamento no frio	15min	15h00	Luzes apagadas	2h
7	15h00	Nado forçado	6min	19h00	Luzes acesas	<i>Overnight</i>
8	19h00	Isolamento	<i>Overnight</i>	19h00	Privação de água e comida	<i>Overnight</i>
9	16h00	Imobilização	1h	19h00	Luzes acesas	<i>Overnight</i>
10	15h00	Nado forçado	6min	22h00	Serragem úmida	<i>Overnight</i>

Fonte: Adaptado de LEPSCH, *et al.*, 2005, baseado em ORTIZ, *et al.*, 1996.

As sessões foram realizadas em uma sala diferente das instalações dos animais e foram realizadas na idade adulta dos camundongos, do dia PN65 ao PN74.

## 5.6 Avaliação comportamental

Os testes comportamentais foram realizados durante e após o protocolo de estresse crônico, em que foi avaliado o nado forçado nos dias P68, P71 e P74 e o LCE em P76, 24h após o último procedimento estressor. Todos os testes comportamentais foram registrados em vídeo por uma câmera digital e o *software EthoVision®* (Noldus, The Netherlands) foi utilizado para a quantificação dos parâmetros comportamentais.

### 5.6.1 Nado Forçado

Este teste foi desenvolvido por Porsolt em 1977 para detecção do efeito antidepressivo de alguns fármacos e é atualmente utilizado para a mensuração de comportamento depressivo devido a sua boa reprodutibilidade e a sua capacidade de detectar antidepressivos clinicamente eficazes. Consiste em um cilindro contendo 14 cm de água onde os animais foram colocados individualmente nos dias P68, P71 e P74 por um período de 6 minutos. O tempo total de imobilidade para cada animal e o período de latência para o início deste comportamento foram mensurados a partir do primeiro minuto (SLATTERY; CRYAN, 2012).

### 5.6.2 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é o principal equipamento utilizado para avaliar a ansiedade em roedores (DE REZENDE PINTO, *et al.*, 2012). Vinte e quatro horas após o protocolo de estresse crônico foi realizado o teste de LCE. O animal foi colocado no centro do labirinto com o focinho voltado para algum dos braços fechados (WALF; FRYE, 2007) e a porcentagem de permanência nos braços abertos, a velocidade média, a frequência de *grooming* e de *head dipping* foram quantificados por 5 minutos.

## 5.7 Eutanásia, coleta de sangue e dissecação

Vinte e quatro horas após o protocolo de estresse crônico, os animais foram submetidos ao teste do LCE (PN75) e logo em seguida foram eutanasiados por decapitação, evitando interferências químicas nos resultados obtidos (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2012; RUGINSK, *et al.*, 2013).

Após a decapitação o sangue foi imediatamente coletado em tubo heparinizado e em seguida foi centrifugado sob refrigeração a 4°C a 3000 rpm por 20 minutos, fracionando o plasma e congelando à -80 °C até a realização das dosagens. Foi realizada a dissecação encefálica para a coleta do hipocampo, estriado, cerebelo e tronco encefálico dos camundongos. Após a dissecação as

estruturas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer* à -80 °C até a realização das análises.

## 5.8 Quantificação de Corticosterona

A corticosterona foi extraída de 25 µL de plasma de cada animal usando 1 mL de etanol e foi quantificada por radioimunoensaio utilizando um padrão de corticosterona (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) e um anticorpo anti-corticosterona (C8784; Sigma) seguindo a metodologia descrita por Jaffe em 2012.

## 5.9 Western blot

Foram realizados ensaios de *Western blot* prévios, a fim de padronizar as diluições dos anticorpos e as quantidades de proteínas que seriam aplicadas em cada estrutura. Foram utilizadas informações contidas na documentação dos anticorpos para determinar as diluições testadas inicialmente.

As proteínas PSD-95, sinaptofisina e sinapsina I foram quantificadas no cerebelo, tronco encefálico, estriado e hipocampo dos camundongos 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 1:2, centrifugadas durante 5 min (1000 g; 4 °C) e ajustadas para a mesma concentração proteica pelo método de Bradford. Em seguida, 130 µL da amostra foram diluídos com 30 µL de tampão de *Laemmli*.

As amostras foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE, sendo utilizado 25µg de proteína por amostra. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após bloqueio com leite desnatado 5% em tampão Tris-Salina por 2 horas, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos em concentrações previamente padronizadas; PSD-95 (Abcam ab13552 – 1:1000); sinapsina I (Abcam (ab64581 – 1:1000); sinaptofisina (Abcam ab8049 – 1:500). Em seguida, as membranas foram lavadas com Tris-Salina e incubadas por 2 horas com um anticorpo secundário marcado com peroxidase. 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 na diluição de 1:5000 (Anti-mouse IgG GE NA931 ou Goat Anti-Rabbit IgG Abcam ab97051), cujas reações envolvem emissão de quimioluminescência. As imagens foram detectadas (ImageQuant 400, GE Healthcare) e digitalizadas (IQuantCapture 400, v.1.0.0, GE Healthcare) e as intensidades das bandas imunorreativas foram comparadas pelo programa ImageQuant TL (1.43u, National Institutes of Health), sendo realizada a normalização dos dados quantificados anteriormente com os valores obtidos de beta-actina (Mouse Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin-Peroxidase Sigma-Aldrich A3854 – 1:25000). Os dados finais foram expressos em porcentagem em relação ao grupo controle (SAL/NE).

### 5.10 Quantificação do BDNF

A quantificação do BDNF foi realizada em amostras de tecido de tronco encefálico, cerebelo, estriado e hipocampo dos camundongos por meio do kit BDNF Emax<sup>®</sup> ImumunoAssay System (Promega) e protocolo adaptado (SZAPACS *et al.*, 2004). Foram adicionados 4 mL de tampão de lise com PMSF e coquetel inibidor de protease em cada tubo contendo as amostras, que foram lisadas e homogeneizadas e em seguida foram centrifugadas a 16000 g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado a -80 °C até o momento da análise.

A microplaca foi revestida com 100  $\mu$ L de Anti-BDNF mAb diluído em tampão carbonato, selada e submetida à incubação *overnight* a 4 °C sem agitação. Após incubação, o conteúdo dos poços foi removido e a microplaca lavada vigorosamente com tampão de lavagem TBS-t. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de tampão Amostra & Block 1X em cada poço. A microplaca foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora e lavada com TBS-t. Após o preparo da curva padrão de BDNF, foram adicionados 100  $\mu$ L dos padrões ou amostras em cada um dos poços. Após uma série de lavagens e incubações, foram adicionados 100  $\mu$ L de ácido clorídrico 1 M para interromper a reação, realizando a leitura espectrofotométrica à 450 nm.

### 5.11 Análises estatísticas

Os resultados das avaliações comportamentais, os ensaios de *Western blot*, BDNF e corticosterona foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA), seguido da comparação múltipla pelo teste Tukey. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) e considerados significativamente diferentes para valores de  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Padronização do protocolo de estresse crônico

Inicialmente, foi realizado um ensaio para padronizar o protocolo de estresse crônico imprevisível por 10 dias. Foram utilizados 20 camundongos fêmeas, que foram divididas em dois grupos: Controle ( $n = 10$ ) e Estresse ( $n = 10$ ).

Vinte e quatro horas após o último estímulo estressor, os animais foram submetidos ao teste do LCE e então eutanasiados, sendo o sangue coletado para a dosagem da corticosterona sérica.

#### 6.1.1 Dosagem de corticosterona sérica

O teste t de Student não pareado indicou não haver diferença significativa da corticosterona sérica entre os grupos controle e estresse, como observado na Figura 3.

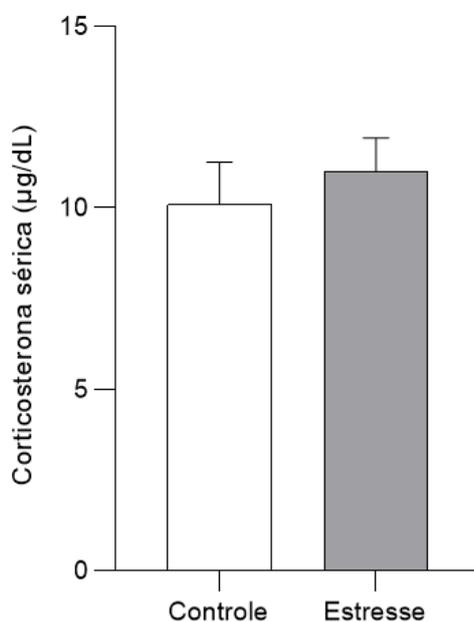


Figura 3 – Corticosterona sérica dos camundongos *Swiss* fêmeas submetidas ou não ao protocolo de estresse crônico imprevisível.

Nota: Grupo estresse,  $n = 10$ ; Grupo controle,  $n = 10$ . Valores expressos em µg/dL (média ± EPM). Os camundongos foram expostos ao protocolo de estresse crônico imprevisível por 10 dias. Teste t de Student.

Fonte: Do autor (2021).

### 6.1.2 Labirinto em cruz elevado

Ao realizar o teste t de Student não pareado foi possível verificar que não houve diferença significativa no tempo de permanência nos braços abertos do LCE entre os grupos controle e estresse (Figura 4A). Contudo, ao avaliar a frequência de *grooming* durante o LCE (Figura 4B), o grupo estresse teve uma frequência de *grooming* significativamente maior que o grupo controle ( $p < 0,001$ ). O protocolo de estresse promoveu um aumento na frequência de *grooming* durante o LCE em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ), mas não alterou o tempo permanência dos animais nos braços abertos.

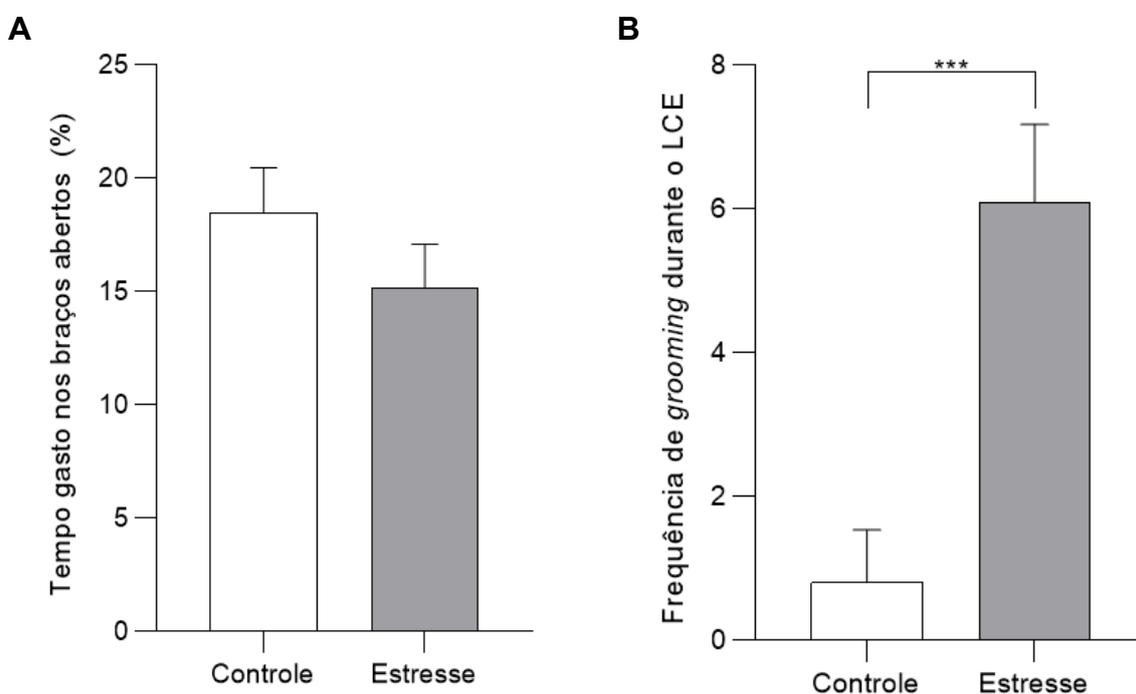


Figura 4 – Parâmetros comportamentais do LCE dos camundongos Swiss fêmeas submetidas ou não ao protocolo de estresse crônico imprevisível.

Nota: Grupo estresse,  $n = 10$ ; Grupo controle,  $n = 10$ . Dados expressos em porcentagem de permanência nos braços abertos (A) e a frequência de *grooming* durante o ensaio (B); média  $\pm$  erro padrão médio (EPM). Os camundongos foram expostos a um protocolo de estresse crônico imprevisível por 10 dias. Teste t de Student. \*\*\* $p < 0,001$  – Grupo estresse em relação ao controle 24h após o último agente estressor.

Fonte: Do autor (2021).

### 6.1.3 Padronização do ensaio de Western Blot

A padronização do ensaio de *Western Blot* possibilitou determinar os parâmetros de concentração proteica e diluição dos anticorpos primários necessários para a detecção das proteínas analisadas. As diluições recomendadas pela fabricante foram suficientes para a realização da densitometria das bandas, sendo utilizadas na quantificação definitiva das amostras (PSD-95 1:1000; Sinaptofisina 1:500 e Sinapsina I 1:1000). Em todas estruturas analisadas, 25 µg de amostra foi satisfatória, após a normalização dos dados com a beta-actina, como observado na Figura 5.

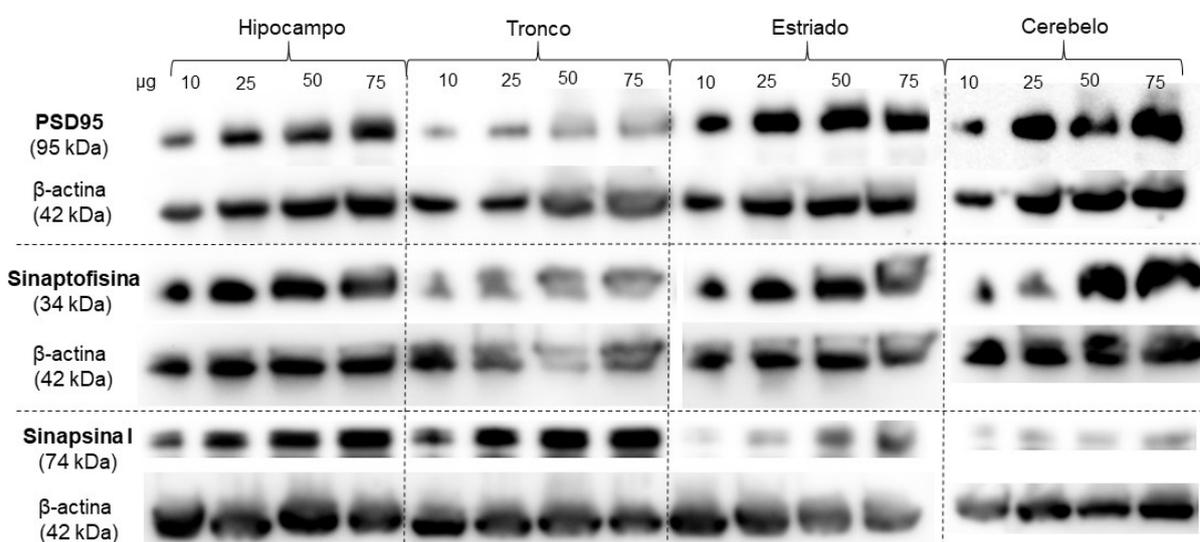


Figura 5 – Imagens representativas das membranas de padronização do ensaio de *Western blot*.

Nota: Foram realizadas quatro aplicações com diferentes quantidades de proteínas totais (10, 25, 50 e 75 µg) nas quatro estruturas dissecadas de camundongos fêmeas na fase adulta: hipocampo, tronco encefálico, estriado e cerebelo.

Fonte: Do autor (2021).

## 6.2 Avaliação da vulnerabilidade ao estresse na vida adulta após exposição à nicotina no início da fase pós-natal

### 6.2.1 Dosagem de corticosterona sérica

Não houve alterações significativas na dosagem de corticosterona sérica em nenhum dos grupos experimentais (Figura 6), indicando que a administração da nicotina e/ou a exposição ao estresse não alteraram as concentrações séricas deste hormônio, no período avaliado.

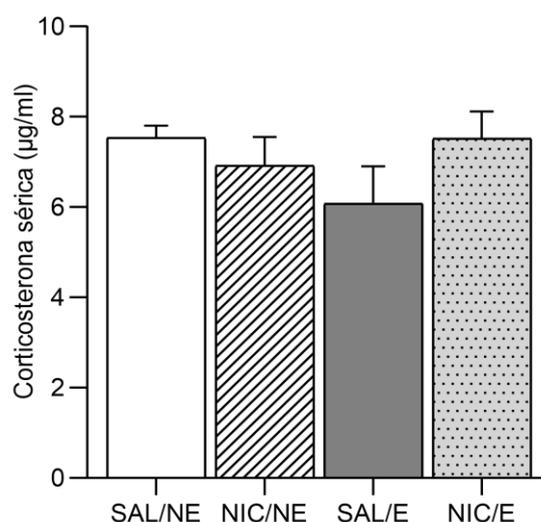


Figura 6 – Corticosterona sérica de camundongos expostos, por meio da amamentação, à salina (SAL/NE, n = 5; e SAL/E, n = 5) ou nicotina (NIC/NE, n = 5; e NIC/E, n = 5) entre P4 e P17 e foram submetidos (SAL/E e NIC/E) ou não (SAL/NE e NIC/NE) a um protocolo de estresse crônico de P65 a P74.

Nota: Valores expressos em µg de corticosterona por dL de plasma. ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey.

Fonte: Do autor (2021).

### 6.2.2 Evolução ponderal

Ao avaliar o peso médio em gramas (g) dos camundongos a cada 10 dias, observa-se que não há diferença significativa entre os grupos experimentais do dia pós-natal 25 (PN25) até o PN65. Após o protocolo de estresse, iniciado em PN65, é possível verificar que houve uma diminuição do peso médio nos grupos submetidos ao protocolo de estresse crônico, como mostra a Figura 7. Houve uma diminuição estatisticamente significativa no peso nos grupos submetidos ao estresse, SAL/E ( $p < 0,001$ ) e NIC/E ( $p < 0,01$ ), quando comparados aos grupos SAL/NE e NIC/NE.

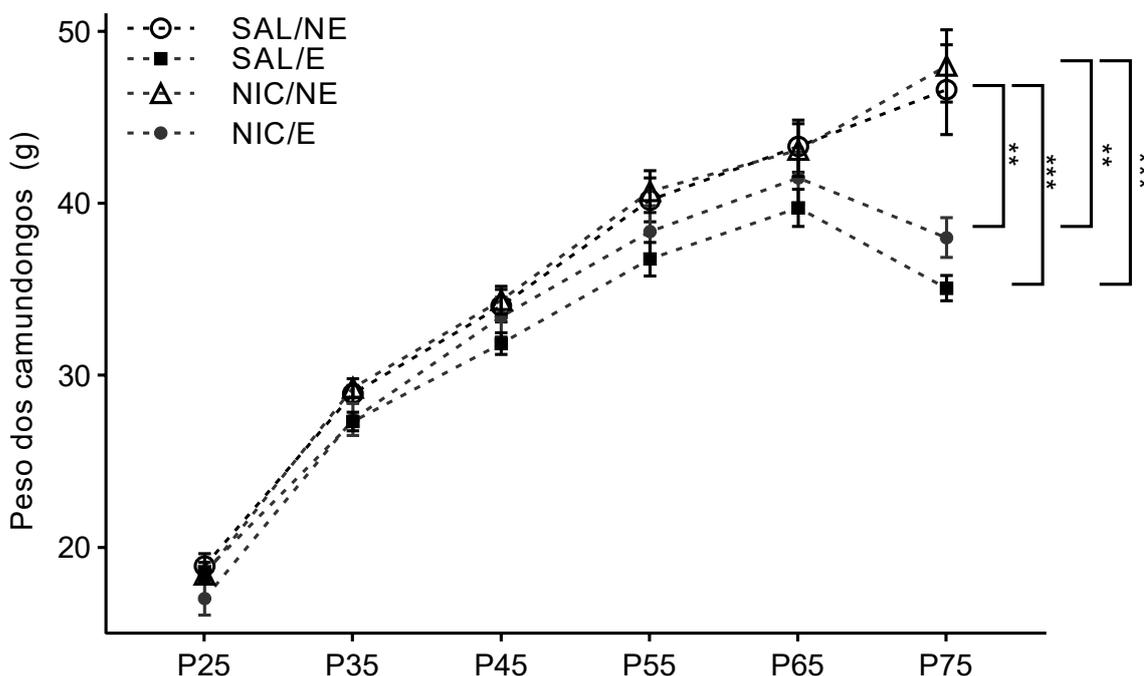


Figura 7 – Evolução ponderal dos camundongos Swiss fêmeas nos diferentes grupos experimentais entre PN25 e PN75.

Nota: Valores expressos em gramas (g), média  $\pm$  EPM. Os camundongos foram expostos, por meio da amamentação, à salina (SAL/NE,  $n = 14$ ; e SAL/E,  $n = 14$ ) ou nicotina (NIC/NE,  $n = 14$ ; e NIC/E,  $n = 14$ ) do quarto dia pós-natal (PN4) até P17 e foram submetidos (SAL/E e NIC/E) ou não (SAL/NE e NIC/NE) a um protocolo de estresse crônico de P65 a P74. ANOVA duas vias, seguido do teste de Tukey. \*\* $p < 0,01$  – SAL/NE em relação ao NIC/E e NIC/NE em relação ao NIC/E em P75. \*\*\* $p < 0,001$  – SAL/NE em relação ao SAL/E e NIC/NE em relação ao SAL/E em P75.

Fonte: Do autor (2021).

### 6.2.3 Labirinto em cruz elevado

No teste do LCE foram avaliados quatro parâmetros comportamentais: a porcentagem de permanência dos camundongos nos braços abertos, a velocidade média (m/s), a frequência de *grooming* e a frequência de *head dipping*, como visto na Figura 8.

A porcentagem de permanência nos braços abertos (Figura 8A) foi semelhante entre todos os grupos, não havendo diferença significativa.

Houve um aumento da velocidade média (Figura 8B) nos animais dos grupos submetidos ao estresse e expostos à salina (SAL/E) ou nicotina (NIC/E) em relação aos grupos que receberam salina e não foi exposto ao estresse (SAL/NE) ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) e com o grupo não submetido ao estresse e exposto à nicotina (NIC/NE), ( $p < 0,0001$  em ambos).

Houve um aumento da frequência de *head dipping* (Figura 8C) no grupo que recebeu nicotina e foi exposto ao estresse (NIC/E) em relação ao grupo NIC/NE, que também foi exposto à nicotina, mas não foi submetido ao estresse ( $p < 0,05$ ).

A frequência de *grooming* (Figura 8D) foi maior apenas no grupo submetido ao estresse e exposto à nicotina (NIC/E) em comparação ao grupo SAL/E, que foi submetido ao estresse e exposto à salina ( $p < 0,05$ ).

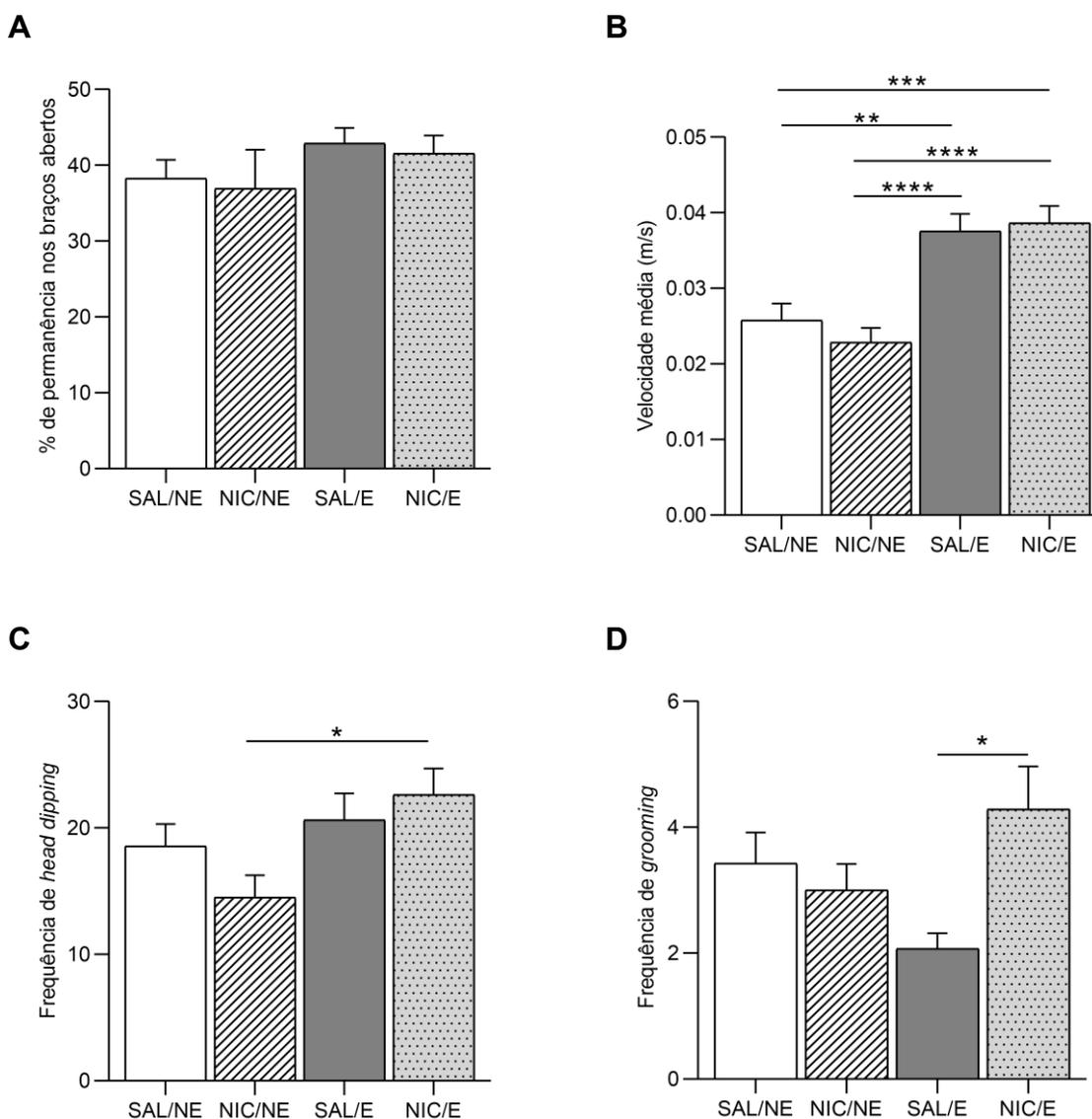


Figura 8 – Camundongos *Swiss* fêmeas foram submetidas ao teste de LCE por 5 minutos no dia PN76. (A) Porcentagem de permanência nos braços abertos; (B) Velocidade média no LCE; (C) Frequência de *head dipping* e (D) Frequência de *grooming* durante o LCE.

Nota: Dados expressos em porcentagem (A), em metros por segundo (B) e frequência (C e D)  $\pm$  EPM. Os camundongos foram expostos, por meio da amamentação, à salina (SAL/NE,  $n = 14$ ; e SAL/E,  $n = 14$ ) ou nicotina (NIC/NE,  $n = 14$ ; e NIC/E,  $n = 14$ ) do quarto dia pós-natal (PN4) até PN17 e foram submetidos (SAL/E e NIC/E) ou não (SAL/NE e NIC/NE) a um protocolo de estresse crônico de PN65 a PN74. ANOVA duas vias, seguido do teste de Tukey. (B)  $**p < 0,01$  – SAL/NE em relação ao SAL/E;  $***p < 0,001$  – NIC/E em relação ao SAL/NE;  $****p < 0,0001$  – SAL/E e NIC/E em relação a NIC/NE. (C)  $*p < 0,05$  – NIC/E em relação ao NIC/NE. (D)  $*p < 0,05$  – NIC/E em relação ao NIC/NE

Fonte: Do autor (2021).

#### 6.2.4 Nado forçado

O teste de nado forçado foi realizado em três dias diferentes (PN68, PN71 e PN74) nos animais submetidos ao protocolo de estresse crônico. Cada animal foi submetido ao teste por 6 minutos, sendo avaliada a distância total percorrida durante o teste (Figura 9A), a latência para o primeiro episódio de imobilidade (Figura 9B) e o tempo total de imobilidade (Figura 9C). Não houve diferença significativa na distância total de nado entre os três dias avaliados (Figura 9A), contudo, houve um aumento significativo na latência para o primeiro quadro de imobilidade no primeiro dia de teste (PN68) no grupo exposto à nicotina em relação ao exposto apenas à salina ( $p < 0,05$ ; Figura 9B). Verificou-se também uma diminuição do tempo de imobilidade no grupo exposto à nicotina em relação ao exposto à salina em P71 e P74, ou seja, no segundo e terceiro dia de nado forçado ( $p < 0,05$ ; Figura 9C).

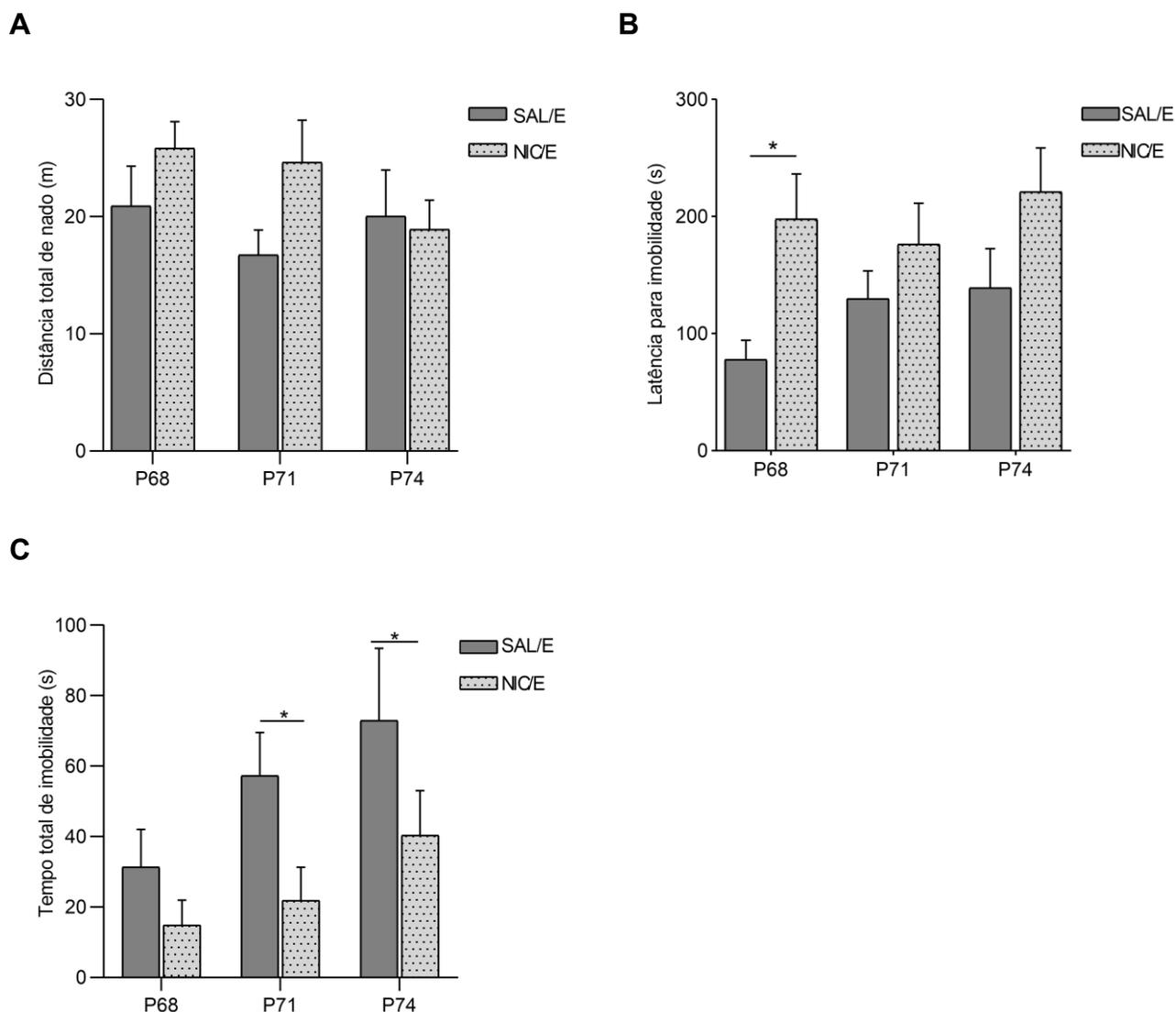


Figura 9 – Camundongos *Swiss* fêmeas foram submetidas a uma seqüência de testes de nado forçado inclusos no protocolo de estresse crônico, sendo realizados em PN68, PN71 e PN74. Os dados indicam a distância percorrida durante o nado (A), a latência para a ocorrência do primeiro episódio de imobilidade (B) e o tempo médio de imobilidade durante o ensaio (C).

Nota: Dados expressos em metros (A) e em segundos (B e C) média  $\pm$  EPM. Os camundongos foram expostos, por meio da amamentação, à salina (SAL/E, n = 14) ou nicotina (NIC/E, n = 14) do quarto dia pós-natal (PN4) até P17 e foram submetidos a um protocolo de estresse crônico de P65 a P74. ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey. \* $p < 0,05$ .

Fonte: Do autor (2021).

### 6.2.5 Quantificação de BDNF

O BDNF é a principal neurotrofina do cérebro e faz a modulação de diversas funções sinápticas, induzindo estímulo ao crescimento e integridade neuronal. A quantificação de BDNF (Figura 10) indicou uma diminuição desta proteína no cerebelo nos grupos em que tiveram administração de nicotina durante a amamentação (NIC/NE e NIC/E) quando comparados aos grupos que receberam apenas salina (SAL/NE e SAL/E, respectivamente;  $p > 0,01$ , Figura 10A). No estriado (Figura 10C), houve diminuição do BDNF nos grupos NIC/NE ( $p < 0,0001$ ), SAL/E ( $p > 0,05$ ) e NIC/E ( $p < 0,01$ ) em comparação ao grupo SAL/NE, além de uma diminuição de BDNF no grupo NIC/NE em comparação ao grupo SAL/E ( $p < 0,05$ ). Já as dosagens de BDNF no tronco encefálico e no hipocampo não detectaram diferença significativa entre os grupos.

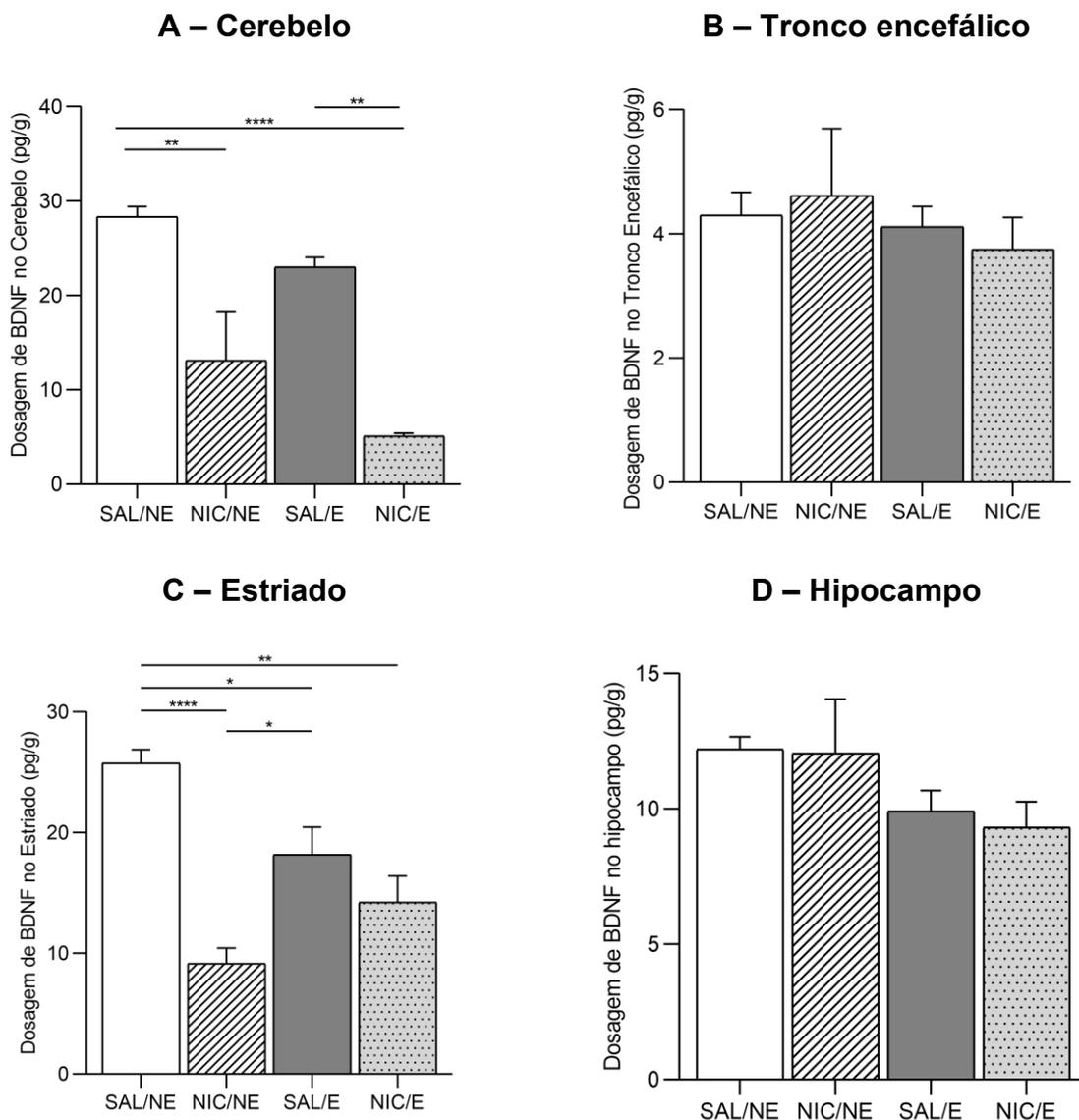


Figura 10 – BDNF no cerebelo (A), tronco encefálico (B), estriado (C) e hipocampo (D) por ensaio de imunoborção enzimática (ELISA).

Nota: Valores expressos em pg de BDNF por grama de cada estrutura. Os camundongos foram expostos, por meio da amamentação, à salina (SAL/NE,  $n = 14$ ; e SAL/E,  $n = 14$ ) ou nicotina (NIC/NE,  $n = 14$ ; e NIC/E,  $n = 14$ ) do quarto dia pós-natal (PN4) até PN17 e foram submetidos (SAL/E e NIC/E) ou não (SAL/NE e NIC/NE) a um protocolo de estresse crônico de P65 a P74. ANOVA duas vias, seguido do teste de Tukey. (A)  $**p < 0,01$  – SAL/NE em relação ao NIC/NE e SAL/E em relação ao NIC/E;  $****p < 0,0001$  – SAL/NE em relação ao NIC/E. (C)  $*p < 0,05$  – SAL/NE e NIC/NE em relação ao SAL/E;  $**p < 0,01$  – SAL/NE em relação ao NIC/E;  $****p < 0,0001$  – SAL/NE em relação ao NIC/NE.

Fonte: Do autor (2021).

## 6.2.6 Quantificação de PSD-95, sinaptofisina e sinapsina I por Western blot

Os ensaios de *Western blot* apresentaram variações dependentes da estrutura e proteína alvo, destacam-se o cerebelo, que apresentou um aumento em todas as proteínas quantificadas nos grupos expostos isoladamente ao estresse ou à nicotina e o tronco encefálico, que apresentou uma diminuição das proteínas PSD-95 e sinaptofisina nos grupos expostos à nicotina e/ou submetidos ao estresse. O estriado e o hipocampo não tiveram alterações significativas em nenhuma das proteínas quantificadas.

### 6.2.6.1 PSD-95

A quantificação do PSD-95 indicou um aumento da concentração desta proteína no cerebelo (Figura 11A) do grupo exposto apenas à nicotina (NIC/NE;  $p < 0,001$ ) e no grupo exposto apenas ao estresse (SAL/E;  $p < 0,01$ ) quando comparados ao grupo controle (SAL/NE). Ainda no cerebelo, houve uma redução do PSD-95 no grupo NIC/E em relação ao SAL/E e ao NIC/NE ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). No tronco encefálico (Figura 11B) houve uma diminuição de PSD-95 no grupo NIC/NE ( $p < 0,001$ ), SAL/E e NIC/E ( $p < 0,0001$ ) em relação ao SAL/NE. No estriado (Figura 11C) e no hipocampo (Figura 11D), a concentração de PSD-95 não apresentou diferença significativa entre os grupos.

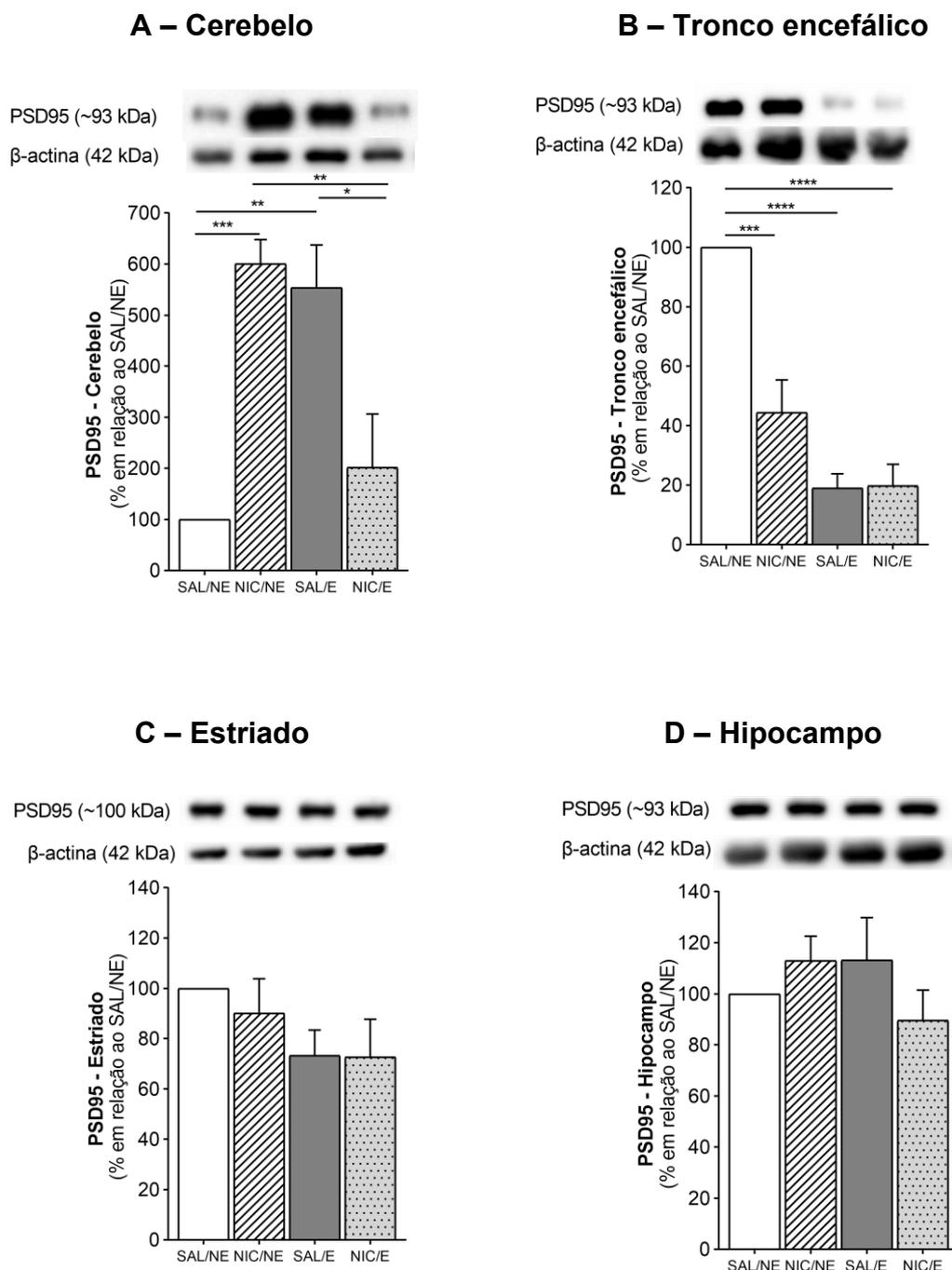


Figura 11 – PSD-95 no cerebelo (a), tronco encefálico (b), estriado (c) e hipocampo (d) por meio de ensaio de *Western blot*.

Nota: Os camundongos foram expostos, por meio da amamentação, à salina (SAL/NE, n = 5; e SAL/E, n = 5) ou nicotina (NIC/NE, n = 5; e NIC/E, n = 5) entre P4 e P17 e foram submetidos (SAL/E e NIC/E) ou não (SAL/NE e NIC/NE) a um protocolo de estresse crônico de P65 a P74. Valores normalizados pela beta-actina e expressos em porcentagem em relação ao grupo controle (SAL/NE). ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey. (A) \* $p < 0,05$  – SAL/E em relação ao NIC/E; \*\* $p < 0,01$  – SAL/NE em relação ao SAL/E e NIC/NE em relação ao NIC/E; \*\*\* $p < 0,001$  – SAL/NE em relação ao NIC/NE. (B) \*\*\* $p < 0,001$  – SAL/NE em relação ao NIC/NE; \*\*\*\* $p < 0,0001$  – SAL/E e NIC/E em relação ao SAL/NE.

Fonte: Do autor (2021).

### 6.2.6.2 Sinaptofisina

A quantificação da sinaptofisina no cerebelo dos camundongos (Figura 12A) indicou um aumento de sua concentração no grupo exposto apenas à nicotina (NIC/NE;  $p < 0,01$ ) e no grupo exposto apenas ao estresse (SAL/E;  $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle (SAL/NE), além de diminuição na concentração no grupo NIC/E em relação ao grupo NIC/NS ( $p < 0,05$ ). No tronco encefálico (Figura 12B), estriado (Figura 12C) e hipocampo (Figura 12D) não houve nenhuma diferença significativa na concentração de sinaptofisina entre os grupos experimentais.

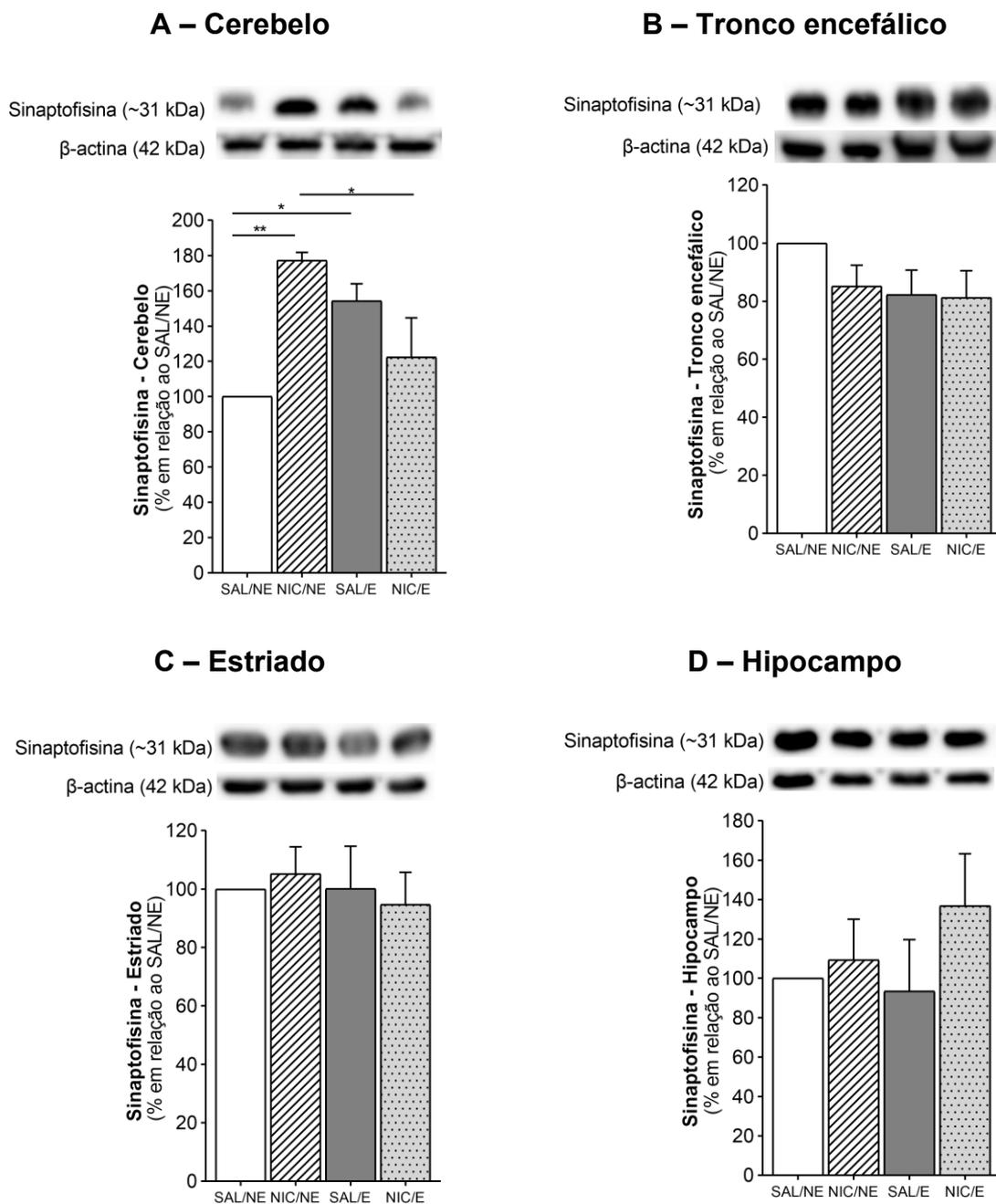


Figura 12 – Sinaptofisina no cerebello (a), tronco encefálico (b), estriado (c) e hipocampo (d) por meio de ensaio de *Western blot*.

Nota: Os camundongos foram expostos, por meio da amamentação, à salina (SAL/NE, n = 5; e SAL/E, n = 5) ou nicotina (NIC/NE, n = 5; e NIC/E, n = 5) entre P4 e P17 e foram submetidos (SAL/E e NIC/E) ou não (SAL/NE e NIC/NE) a um protocolo de estresse crônico de P65 a P74. Valores normalizados pela beta-actina e expressos em porcentagem em relação ao grupo controle (SAL/NE). ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey. (A) \* $p < 0,05$  – SAL/NE em relação ao SAL/E e NIC/NE em relação ao NIC/E; \*\* $p < 0,01$  – SAL/NE em relação ao NIC/NE.

Fonte: Do autor (2021).

### 6.2.6.3 Sinapsina I

A exposição isolada à nicotina (NIC/NE) ou ao estresse (SAL/E) promoveu um aumento da concentração de sinapsina I no cerebelo (Figura 13A) em relação ao grupo SAL/NE ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) e houve uma diminuição da mesma proteína no grupo exposto à nicotina e submetido ao estresse (NIC/E) em relação ao NIC/NE ( $p < 0,01$ ). No tronco encefálico houve diminuição na concentração de sinapsina I nos grupos NIC/NE, SAL/E e NIC/E ( $p < 0,0001$ ; Figura 13B). Nenhum dos tratamentos alterou a concentração de sinapsina I no estriado (Figura 13C) ou no hipocampo (Figura 13D).

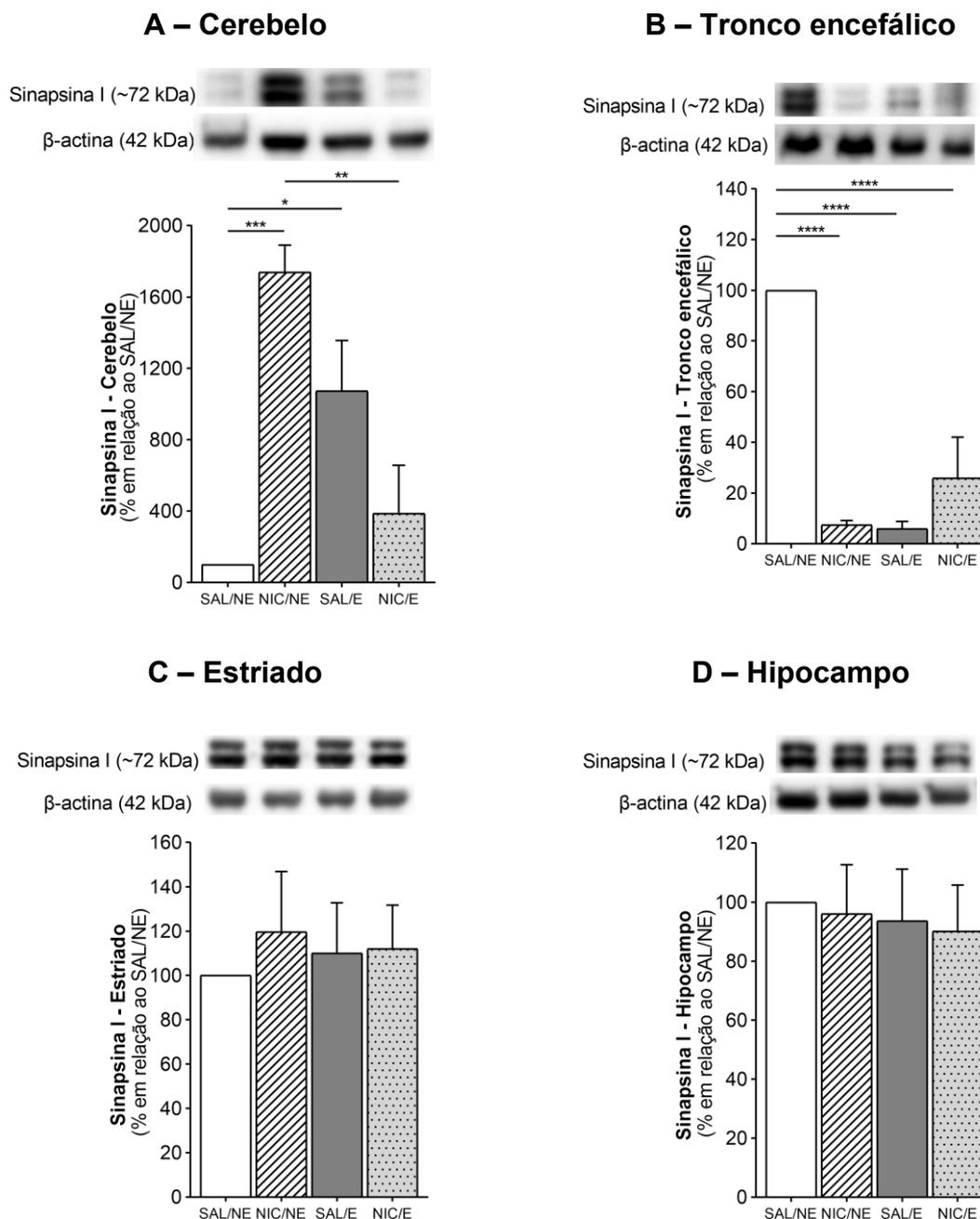


Figura 13 – Sinapsina I no cerebello (a), tronco encefálico (b), estriado (c) e hipocampo (d) por meio de ensaio de *Western blot*.

Nota: Os camundongos foram expostos, por meio da amamentação, à salina (SAL/NE, n = 5; e SAL/E, n = 5) ou nicotina (NIC/NE, n = 5; e NIC/E, n = 5) entre P4 e P17 e foram submetidos (SAL/E e NIC/E) ou não (SAL/NE e NIC/NE) a um protocolo de estresse crônico de P65 a P74. Valores normalizados pela densitometria de beta-actina e expressos em porcentagem em relação ao grupo controle (SAL/NE). ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey. (A) \* $p < 0,05$  – SAL/NE em relação ao SAL/E; \*\* $p < 0,01$  – SAL/NE em relação ao SAL/E; \*\*\* $p < 0,001$  – SAL/NE em relação ao NIC/NE. (B) \*\*\*\* $p < 0,0001$  – SAL/NE em relação a NIC/NE, SAL/E e NIC/E.

Fonte: Do autor (2021).

## 7 DISCUSSÃO

As terapias de reposição de nicotina são consideradas alternativas mais seguras que o tabagismo durante a amamentação considerando que há a diminuição dos compostos transferidos para o leite (HOTHAM; HOTHAM, 2015; ILETT *et al.*, 2003), entretanto é necessária uma avaliação mais aprofundada dos efeitos dos substitutos do cigarro em mulheres grávidas, lactantes e nos bebês devido à escassez de ensaios que avaliam estes efeitos a longo prazo (JAMSHED *et al.*, 2020; REECE-STREMTAN; MARINELLI, 2015). O atual estudo indica que a administração de nicotina pela amamentação no início do período pós-natal em camundongos Swiss fêmeas submetidas a um protocolo de estresse crônico imprevisível na fase adulta promove alterações comportamentais observadas no LCE e o NF, e promoveu alterações bioquímicas em diferentes estruturas cerebrais, observadas pela diminuição da concentração de BDNF no estriado e de PSD-95 e sinapsina I no tronco encefálico. Nesse estudo, também foi possível observar que a exposição isolada à nicotina no início da fase pós-natal ou protocolo de estresse crônico na vida adulta aumentou a expressão das proteínas PSD-95, sinaptofisina e sinapsina I no cerebelo.

A dosagem de corticosterona sérica não apresentou diferença significativa entre os grupos. Gong e colaboradores (2015) quantificaram em diferentes dias a corticosterona sérica em camundongos fêmeas submetidas a um protocolo de estresse por contenção, sendo que o maior nível de corticosterona foi observado no primeiro dia de estresse, tendo os níveis diminuídos gradativamente até o 18º dia de protocolo, quando os níveis de corticosterona voltaram a aumentar. No mesmo estudo, as alterações permanentes foram observadas apenas em protocolos com etapas estressoras mais longas e agressivas que as utilizadas no presente trabalho, como no teste de nado forçado, em que o nível máximo de corticosterona sérica foi verificado apenas no ensaio com 40 minutos de duração. Assim, a estabilidade da concentração sérica de corticosterona observada pode ser decorrente de uma adaptação característica da fase de esgotamento do estresse, podendo ter ocorrido um aumento agudo nos dias iniciais do protocolo seguido de uma diminuição progressiva.

Os dados obtidos em relação à evolução ponderal dos camundongos são condizentes com a literatura, já que diversos estudos indicam haver uma diminuição

do peso corporal em roedores submetidos a diferentes protocolos de estresse crônico (CHRISTIANSEN *et al.*, 2008; FURMAN *et al.*, 2019; LÓPEZ *et al.*, 2018). De fato, o estudo de Jeong *et al.* (2013) verificou que camundongos tendem a perder peso corporal quando submetidos a estresse por contenção. O sexo dos animais é um fator a ser considerado na relação entre peso e estresse. Furman *et al.* (2019) avaliaram um protocolo de estresse crônico por restrição em camundongos machos e fêmeas. Os autores verificaram redução do peso corporal em ambos os sexos submetidos à contenção em relação ao grupo controle. No entanto, ao comparar os sexos, eles observaram que os camundongos machos tiveram uma menor diminuição no ganho de peso corporal em relação às fêmeas, evidenciando que as fêmeas são mais propensas a perderem peso ao serem submetidas ao estresse, mas a relação entre esses dois fatores ainda não foi totalmente elucidada. Com relação à interação entre a nicotina e o peso dos animais, em um estudo que avaliou o peso corporal de camundongos expostos à nicotina diluída na concentração de 200 µg/mL na água de beber, verificou-se uma diminuição do peso corporal dos animais apenas 18 dias após o consumo, mostrando que para interferir no peso corporal a nicotina deve ser administrada em uma dose e um período maior que o utilizado em nosso estudo (CALARCO *et al.*, 2017).

Ao avaliar os parâmetros comportamentais em estudos sobre estresse é possível verificar uma heterogeneidade dos resultados, já que os protocolos experimentais, as linhagens e as espécies dos animais utilizados estão diretamente relacionados com o comportamento intrínseco de cada modelo (DUCOTTET, BELZUNG, 2008). Neste contexto, foi realizada uma avaliação dos dados obtidos com estudos que mais se assemelharam metodologicamente com o presente trabalho.

O LCE é um modelo amplamente utilizado para avaliação da ansiedade em roedores, sendo que uma menor permanência do animal nos braços abertos do aparato indica maior ansiedade. No presente estudo observamos que o tratamento com nicotina no início do período pós-natal e o protocolo de estresse na vida adulta não foram capazes de promover alterações estatisticamente significativas na permanência dos braços abertos do LCE, resultado semelhante ao obtido pelo estudo de Morais-Silva e colaboradores (2016), em que foi realizado um protocolo de estresse por contenção durante 5 dias consecutivos em camundongos *Swiss*

machos, não havendo alteração no tempo de permanência nos braços abertos do LCE.

Ainda no LCE, foi avaliado a velocidade média dos camundongos, sendo observado um aumento da velocidade nos grupos submetidos ao estresse. O aumento da velocidade média durante o LCE pode indicar aumento da ansiedade, já que a administração de compostos ansiolíticos em camundongos como o haloperidol e a fluoxetina promovem uma diminuição da velocidade e do tempo nos braços abertos (YANG *et al.*, 2015).

O *grooming* é um comportamento de autolimpeza realizada por roedores, sendo que o aumento da frequência deste comportamento indica de aumento da ansiedade. No presente estudo, a administração de nicotina e o protocolo de estresse isolados não foram suficientes para alterar a quantidade de *grooming* realizada durante o LCE, contudo no grupo em que foi administrada a nicotina na amamentação e foi submetido ao estresse na vida adulta houve uma frequência de *grooming* maior em relação que o grupo que recebeu apenas salina e foi submetido ao estresse. Os resultados da frequência de *grooming* nos grupos submetidos ao estresse são condizentes com o estudo de Yalcin e colaboradores (2008) que avaliou a frequência de *grooming* em camundongos submetidos a estresse crônico imprevisível por seis semanas e não houve alteração significativa desse comportamento.

O estudo de Zarridast e colaboradores (1998) indicou uma relação direta da administração de nicotina com o aumento da frequência de *grooming*, sendo derivada de alterações no mecanismo muscarínico, o que pode justificar o aumento da frequência de *grooming* no grupo NIC/E. Adicionalmente, Myslivecek e Kvetnasky (2006) demonstraram que o estresse promove alterações nos receptores muscarínicos, sendo estas modificações dependentes do caráter químico, físico ou social dos estressores. No LCE o aumento de *head dipping* também está relacionado com diminuição da ansiedade (ADUEMA *et al.*, 2018) havendo um aumento da frequência deste comportamento em camundongos expostos a diversos compostos tradicionalmente ansiolíticos (SARKAR, 2020; TAKEDA; TSUJI; MATSUMIYA, 1998).

No primeiro ensaio de NF foi observado no grupo exposto a nicotina um aumento da latência para imobilidade e no segundo e terceiro NF uma diminuição do tempo total de imobilidade. Não houve diferença significativa na distância total de

nado. Os resultados obtidos indicam que a nicotina promove efeitos do tipo antidepressivo em camundongos submetidos ao nado forçado durante o protocolo de estresse. O estudo de Tizabi e colaboradores (2000) demonstrou a capacidade da nicotina de reduzir o tempo de imobilidade no teste de nado forçado, sendo este efeito anulado pela administração de mecamilamina, um antagonista não seletivo e não competitivo da nicotina, sugerindo que este efeito esteja relacionado a ligação da nicotina aos receptores nicotínicos, sendo este resultado replicado por Vazquez-Palacios em 2004 e por Vieyra-Reyes em 2008.

Os animais expostos à nicotina tiveram uma redução dos níveis de BDNF no cerebelo e os animais expostos à nicotina e/ou ao estresse tiveram uma diminuição de BDNF no estriado. Adicionalmente, um estudo clínico realizado por Lavesi e colaboradores (2018) mostra uma diminuição no BDNF do cerebelo de bebês que vieram ao óbito e foram expostos ao cigarro. Em camundongos, o BDNF cerebelar é relacionado ao aumento das respostas exploratórias e em busca de novidades no labirinto em T elevado (LARICCHIUTA *et al.*; 2018). O período neonatal é uma fase crítica do desenvolvimento do cerebelo em roedores, visto que a neurogênese desta estrutura ocorre integralmente após o nascimento (DWYER *et al.*, 2009). Além disso, a ativação precoce dos receptores nicotínicos afeta diretamente o desenvolvimento dos neuroblastos cerebelares primários (OPANASHUK *et al.*, 2001). O estriado tem participação no controle da motricidade e no sistema límbico (HUNNICUTT *et al.*, 2016; CHOI *et al.*, 2012). Uma diminuição nos níveis de BDNF estriatal já foi relatada em ratos submetidos à separação materna (LIPPMANN *et al.*, 2007) e em ratos submetidos a estresse crônico durante 4 semanas (TOTH *et al.*, 2008). O estudo de Ortega e colaboradores (2012) demonstrou que camundongos expostos diariamente a nicotina (18 mg/kg) tiveram uma diminuição de BDNF no estriado.

Nos animais expostos à nicotina e/ou ao estresse houve uma diminuição de PSD-95 e sinapsina I no tronco encefálico, o que pode ser um indicativo de efeitos deletérios em elementos sinápticos e pós-sinápticos, já que o PSD-95 estabelece a transdução de sinal na zona sináptica organizando receptores e moléculas (DOSEMECI *et al.*, 2007). A sinapsina I está relacionada com a neurotransmissão e sinaptogênese (GITLER, 2004). Os resultados obtidos são complementares ao estudo de Torres e colaboradores (2015) que verificaram uma diminuição nas proteínas específicas da mielina no tronco encefálico em camundongos expostos à fumaça de cigarro durante a fase pós-natal, evidenciando uma sensibilidade desta

estrutura aos compostos presentes no cigarro. Vale destacar que a exposição à fumaça do cigarro aumenta em cerca de cinco vezes a chance de síndrome da morte súbita infantil.

Em conjunto, os dados obtidos pelo estudo mostram que a exposição à nicotina em uma fase crítica do desenvolvimento reduz o comportamento do tipo depressivo durante o estresse na fase adulta, além de interferir em elementos da transmissão sináptica em diferentes estruturas encefálicas. Ainda, apesar de não ser capaz de alterar a concentração sérica de corticosterona, o protocolo de estresse imprevisível induziu uma diminuição do peso corporal em camundongos, além de aumentar a velocidade média dos animais no LCE. A associação entre exposição à nicotina no período pós-natal e estresse na fase adulta levou ao aumento da frequência de *grooming* e de *head dipping* durante o LCE, diminuiu a concentração de BDNF no estriado, de PSD-95 e sinapsina I no tronco encefálico. Já a exposição isolada à nicotina ou ao estresse, aumentou os níveis de PSD-95, sinaptofisina e sinapsina I no cerebelo.

## 8 CONCLUSÕES

- A corticosterona sérica não sofreu alterações pelo protocolo de estresse ou pela exposição no início do período pós-natal à nicotina;
- O protocolo de estresse crônico de 10 dias induziu uma diminuição do peso corporal em camundongos; enquanto a exposição à nicotina no início do período pós-natal não foi capaz de promover alterações no peso na vida adulta;
- O protocolo de estresse não promoveu alteração na permanência nos braços abertos do LCE, mas foi capaz de aumentar a velocidade média dos animais no mesmo ensaio. O grupo exposto à nicotina e submetido ao estresse teve um aumento da frequência de *grooming* e de *head dipping* durante o LCE;
- No nado forçado, a exposição a nicotina durante o início do período pós-natal reduziu o comportamento do tipo depressivo durante o estresse nos camundongos, já que houve diminuição do tempo de imobilidade e aumento da latência para imobilidade;
- A nicotina promoveu uma diminuição da quantidade de BDNF no cerebelo e os animais expostos à nicotina e/ou ao estresse tiveram uma diminuição de BDNF no estriado;
- Os ensaios de *Western blot* indicaram um aumento de PSD-95, sinaptofisina e sinapsina I no cerebelo dos animais expostos isoladamente à nicotina ou ao estresse. No tronco encefálico, houve uma diminuição da concentração das proteínas PSD-95 e sinapsina I dos camundongos expostos à nicotina e/ou submetidos ao protocolo de estresse.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS COMMITTEE ON DRUGS. Transfer of drugs and other chemicals into human milk. **Pediatrics**, Media, v. 108, n. 3, p. 776, 2001.
- ANDREASEN, Jesper T.; REDROBE, John P. Antidepressant-like effects of nicotine and mecamylamine in the mouse forced swim and tail suspension tests: role of strain, test and sex. **Behavioural pharmacology**, Utreque v. 20, n. 3, p. 286-295, 2009.
- BANDIERA, F. *et al.* Secondhand smoke exposure and mental health among children and adolescents. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**, Seattle, v. 165, n. 4, p. 332-338, 2011.
- BENOWITZ, N. Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, Philadelphia, v. 83, n. 4, p. 531-541, 2008.
- \_\_\_\_\_. Female sex and oral contraceptive use accelerate nicotine metabolism. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, Philadelphia, v. 79, n. 5, p. 480-488, 2006.
- \_\_\_\_\_. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. **Nicotine psychopharmacology**, Bethesda, Springer, Berlin, Heidelberg, 2009.
- CALARCO, A., *et al.* Access to nicotine in drinking water reduces weight gain without changing caloric intake on high fat diet in male C57BL/6J mice. **Neuropharmacology**, Coventry, v. 123, p. 210-220, 2017.
- CASSANO, A., *et al.* Anatomic, hematologic, and biochemical features of C57BL/6NCrl mice maintained on chronic oral corticosterone. **Comparative medicine**, Memphis, v. 62, n. 5, p. 348-360, 2012.
- CEZÁRIO, C. **Sensibilização cruzada entre estresse e nicotina**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação - Farmácia-Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012.
- CHRISTIANSEN, S., *et al.* Fluoxetine reverts chronic restraint stress-induced depression-like behaviour and increases neuropeptide Y and galanin expression in mice. **Behavioural brain research**, College Station, v. 216, n. 2, p. 585-591, 2011.
- CHOI, Eun Young; YEO, BT Thomas; BUCKNER, Randy L. The organization of the human striatum estimated by intrinsic functional connectivity. **Journal of neurophysiology**, Seattle, v. 108, n. 8, p. 2242-2263, 2012.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais** - Conceitos e procedimentos recomendados. Rio de Janeiro, 2012.

COX, S.; DAWKINS, L. Global and local perspectives on tobacco harm reduction: what are the issues and where do we go from here? **Harm Reduction Journal**, Melbourne, v. 15, n. 1, p. 1–2, 22 jun. 2018.

DAGYTE, G. *et al.* Chronic stress and antidepressant agomelatine induce region-specific changes in synapsin I expression in the rat brain. **Journal of neuroscience research**, Los Angeles, v. 89, n. 10, p. 1646-1657, 2011.

DE REZENDE PINTO, Wladimir Bocca Vieira *et al.* Teste de LCE: aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 102-120, 2012.

DOSEMECI, Ayse *et al.* Composition of the synaptic PSD-95 complex. **Molecular & Cellular Proteomics**, Rockville, v. 6, n. 10, p. 1749-1760, 2007.

DUCOTTET, C.; BELZUNG, C. Correlations between behaviours in the elevated plus-maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: evidence from inbred strains of mice. **Behavioural brain research**, College Station, v. 156, n. 1, p. 153-162, 2005.

DWYER, Jennifer B.; MCQUOWN, Susan C.; LESLIE, Frances M. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. **Pharmacology & therapeutics**, Oxford, v. 122, n. 2, p. 125-139, 2009.

ENGELMANN, M.; LANDGRAF, R.; WOTJAK, C. The hypothalamic–neurohypophysial system regulates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis under stress: an old concept revisited. **Frontiers in neuroendocrinology**, British Columbia, v. 25, n. 3-4, p. 132-149, 2004.

ESPEJO, E. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behavioural brain research**, College Station, v. 86, n. 1, p. 105-112, 1997.

FARSALINOS, K.; LE HOUEZEC, J. Regulation in the face of uncertainty: the evidence on electronic nicotine delivery systems (e-cigarettes). **Risk management and healthcare policy**, London, v. 8, p. 157, 2015.

FURMAN, O.; TSOORY, M.; CHEN, A. Sex differences in chronic social stress models in mice. **bioRxiv**, Laurel Hollow, p. 605527, 2019.

GILLILAND, F.; LI, Y.; PETERS, J. Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v. 163, n. 2, p. 429-436, 2001.

GONG, Shuai *et al.* Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 2, p. e0117503, 2015.

GOODCHILD, M.; NARGIS, N.; D'ESPAIGNET, E. Global economic cost of smoking-attributable diseases. **Tobacco control**, London, v. 27, n. 1, p. 58-64, 2018.

GORDON, Ian T.; WHELAN, Patrick J. Brainstem modulation of locomotion in the neonatal mouse spinal cord. **The Journal of physiology**, London, v. 586, n. 10, p. 2487-2497, 2008.

HENNINGFIELD, J.; ZELLER, M. Nicotine psychopharmacology research contributions to United States and global tobacco regulation: a look back and a look forward. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 184, n. 3-4, p. 286-291, 2006.

HUGHES, John R.; KEELY, Josue; NAUD, Shelly. Shape of the relapse curve and long-term abstinence among untreated smokers. **Addiction**, London, Hoboken, v. 99, n. 1, p. 29-38, 2004.

HUNNICUTT, Barbara J., et al. A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization. **elife**, Cambridge, v. 5 p. 3-9, 2016.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Pesquisa Nacional de Saúde 2013**: Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasília, 2014.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Pesquisa Nacional de Saúde 2013**: Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasília, 2014.

IHRA (INTERNATIONAL HARM REDUCTION ASSOCIATION). **O que é redução de danos?** Uma posição oficial da Associação Internacional de Redução de Danos. London, 2010.

JARVIS, Martin J. Why people smoke. **Bmj**, London, v. 328, n. 7434, p. 277-279, 2004.

JAFFE, Bernard (Ed.). **Methods of hormone radioimmunoassay**. Amsterdam: Elsevier, 2012.

JEONG, Joo Yeon; LEE, Dong Hoon; KANG, Sang Soo. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. **Endocrinology and metabolism**, Seoul, v. 28, n. 4, p. 288-296, 2013.

JONES, M. *et al.* Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. **Breast Cancer Research**, London, v. 19, n. 1, p. 118, 2017.

KAUFMANN, D., BRENNAN, K. The effects of chronic stress on migraine relevant phenotypes in male mice. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, Lausanne, v. 12, 2018.

KISPERT, S.; MCHOWAT, J. Recent insights into cigarette smoking as a lifestyle risk factor for breast cancer. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, Macclesfield, v. 9, p. 127, 2017.

KJELLBERG, L. *et al.* Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. **British journal of cancer**, London, v. 82, n. 7, p. 1332, 2000.

LARICCHIUTA, Daniela *et al.* Cerebellar BDNF promotes exploration and seeking for novelty. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 485-498, 2018.

LAVEZZI, Anna M. *et al.* Pathobiological expression of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebellar cortex of sudden fetal and infant death victims. **International Journal of Developmental Neuroscience**, New Jersey, v. 66, p. 9-17, 2018.

LENT, R. **100 bilhões de neurônios**. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2010.

LEOPÉRCIO, W.; GIGLIOTTI, A. Tabagismo e suas peculiaridades durante a gestação: uma revisão crítica. **J Bras Pneumol**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 176-85, 2004.

LIPPMANN, Melanie *et al.* Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. **European Journal of Neuroscience**, Glasgow, v. 25, n. 10, p. 3091-3098, 2007.

LOMBARDI, Elisa Maria Siqueira *et al.* O tabagismo e a mulher: riscos, impactos e desafios. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 37, n. 1, p. 118-128, 2011.

LÓPEZ, A., *et al.* Chronic unpredictable mild stress progressively disturbs glucose metabolism and appetite hormones in rats. **Acta Endocrinologica**, Bucharest, v. 14, n. 1, 2018.

LUTFY, Kabirullah *et al.* Repeated stress alters the ability of nicotine to activate the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. **Journal of neurochemistry**, New Jersey, v. 99, n. 5, p. 1321-1327, 2006.

LUMLEY, J. *et al.* Interventions for promoting smoking cessation during pregnancy. **The Cochrane database of systematic reviews**, London, n. 3, p. CD001055, 2009.

MADSEN, B. *et al.* Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina - Population-based case-control study in Denmark. **International journal of cancer**, New Jersey, v. 122, n. 12, p. 2827-2834, 2008.

MAN, Che Nin *et al.* Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 844, n. 2, p. 322-327, 2006.

MANNUCCI, Carmen *et al.* Long-term effects of nicotine on the forced swimming test in mice: an experimental model for the study of depression caused by smoke. **Neurochemistry international**, Tokyo, v. 49, n. 5, p. 481-486, 2006.

MENEZES, A. *et al.* Tabagismo na coorte de nascimentos de 1982: da adolescência à vida adulta. **Revista de Saúde Pública**, Pelotas, v. 42, p. 78-85, 2008.

MENNELLA, Julie A.; YOURSHAW, Lauren M.; MORGAN, Lindsay K. Breastfeeding and smoking: short-term effects on infant feeding and sleep. **Pediatrics**, Media, v. 120, n. 3, p. 497-502, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigitel Brasil 2011**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

MONTEIRO, Carlos Augusto *et al.* Population-based evidence of a strong decline in the prevalence of smokers in Brazil (1989-2003). **Bulletin of the World Health Organization**, Genebra, v. 85, p. 527-534, 2007.

MORAIS-SILVA, G. *et al.* Concomitant stress potentiates the preference for, and consumption of, ethanol induced by chronic pre-exposure to ethanol. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 49, n. 1, 2016.

MOREL, C. *et al.* Nicotinic receptors mediate stress-nicotine detrimental interplay via dopamine cells' activity. **Molecular psychiatry**, New York, v. 23, n. 7, p. 1597-1605, 2018.

MUAKAD, Irene Batista. Tabagismo: maior causa evitável de morte do mundo. **Revista da Faculdade de Direito**, São Paulo, v. 109, p. 527-558, 2014.

MURAKAMI, S. *et al.* Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. **Neuroscience research**, Cambridge, v. 53, n. 2, p. 129-139, 2005.

MYSLIVEČEK, J.; KVETŇANSKÝ, R. The effects of stress on muscarinic receptors. Heterologous receptor regulation: yes or no?. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, New Jersey, v. 26, n. 3, p. 235-251, 2006.

NIAURA, Raymond *et al.* Symptoms of depression and survival experience among three samples of smokers trying to quit. **Psychology of Addictive Behaviors**, Washington, v. 15, n. 1, p. 13, 2001.

NUNES, S.; CASTRO, M. **Tabagismo**: abordagem, prevenção e tratamento. Londrina: Eduel, 2010.

ÖBERG, M. *et al.* Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. **The lancet**, London, v. 377, n. 9760, p. 139-146, 2011.

OPANASHUK, Lisa A.; PAULY, James R.; HAUSER, Kurt F. Effect of nicotine on cerebellar granule neuron development. **European Journal of Neuroscience**, Glasgow, v. 13, n. 1, p. 48-56, 2001.

ORTEGA, Leonardo A. *et al.* Effects of chronic low-and high-dose nicotine on cognitive flexibility in C57BL/6J mice. **Behavioural brain research**, College Station, v. 238, p. 134-145, 2013.

PADURARIU, M. *et al.* Describing some behavioural animal models of anxiety and their mechanistis with special reference to oxidative stress and oxytocin relevance. **International journal of veterinary science and medicine**, London, v. 5, n. 2, p. 98-104, 2017.

PATTINSON, H.; TAYLOR, P.; PATTINSON, M. The effect of cigarette smoking on ovarian function and early pregnancy outcome of in vitro fertilization treatment. **Fertility and sterility**, New York, v. 55, n. 4, p. 780-783, 1991.

PECHACEK, Terry F. *et al.* The potential that electronic nicotine delivery systems can be a disruptive technology: results from a national survey. **Nicotine & Tobacco Research**, Oxford, v. 18, n. 10, p. 1989-1997, 2016.

PINTO, M. *et al.* Carga de doença atribuível ao uso do tabaco no Brasil e potencial impacto do aumento de preços por meio de impostos. **Documento técnico IECS**, Buenos Aires, v. 21, 2017.

POLOSA, R. *et al.* A fresh look at tobacco harm reduction: the case for the electronic cigarette. **Harm reduction journal**, Melbourn, v. 10, n. 1, p. 19, 2013.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. L. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, London, v. 266, n. 5604, p. 730, 1977.

POSSELT, W.; REIMANN, L. Chemische Untersuchungen des Tabaks und Darstellung des eigenhumlichen wirksamen Principes dieser Pflanze. **Geigers Magazin der Pharmazie**, Berlim, v. 24, p. 138-61, 1828.

RABENSTEIN, R. *et al.* The nicotinic antagonist mecamylamine has antidepressant-like effects in wild-type but not  $\beta 2$ - or  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice. **Psychopharmacology**, Berlim, v. 189, n. 3, p. 395-401, 2006.

REICHERT, V. *et al.* Women and tobacco dependence. **Obstetrics and Gynecology Clinics**, New Mexico, v. 36, n. 4, p. 877-890, 2009.

REITSMA, B. *et al.* Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and territories, 1990–2015: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 389, n. 10082, p. 1885-1906, 2017.

ROSEMBERG, J.; ROSEMBERG, A.; MORAES, M. **Nicotina**: droga universal. Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo, São Paulo, 2003.

ROZOV, T. *et al.* Hábito de fumar das gestantes e parturientes de um hospital universitário e seus conhecimentos sobre os efeitos do fumo em fetos e lactentes. **Arquivos Médicos do ABC**, Santo André, v. 29, n. 1, 2004.

RUGINSK, Silvia G. *et al.* Anandamide modulates the neuroendocrine responses induced by extracellular volume expansion. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Melbourn, v. 40, n. 10, p. 698-705, 2013.

SAAL, Daniel *et al.* Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. **Neuron**, v. 37, n. 4, p. 577-582, 2003.

SAMET, J.; YOON, S. **Women and the tobacco epidemic**: challenges for the 21st century. Geneva: World Health Organization, 2001.

SARKAR, Deepa. A review of behavioral tests to evaluate different types of anxiety and anti-anxiety effects. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 341-351, 2020.

SELYE, Hans. **The Stress of Life**. New York: McGraw-Hill, 1978.

SHYTLE, R. D. *et al.* Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants. **Molecular psychiatry**, Cambridge, New York, v. 7, n. 6, p. 525, 2002.

SIMONS, Christopher T. *et al.* Nicotinic receptor involvement in antinociception induced by exposure to cigarette smoke. **Neuroscience letters**, New Haven, v. 389, n. 2, p. 71-76, 2005.

SINHA, Rajita *et al.* Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. **Archives of general psychiatry**, Philadelphia, v. 63, n. 3, p. 324-331, 2006.

SLATTERY, D.; CRYAN, J. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature protocols**, London, v. 7, n. 6, p. 1009, 2012.

STERLEMANN, Vera *et al.* Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: implications for stress-related disorders. **Hormones and behavior**, Vancouver, v. 53, n. 2, p. 386-394, 2008

SZAPACS, Matthew E. *et al.* Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. **Journal of neuroscience methods**, Misida, v. 140, n. 1-2, p. 81-92, 2004.

TANG, S.; MACHAALANI, R.; WATERS, K. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and TrkB in the piglet brainstem after post-natal nicotine and intermittent hypercapnic hypoxia. **Brain research**, College Station, v. 1232, p. 195-205, 2008.

TATARSKY, A. Harm reduction psychotherapy: Extending the reach of traditional substance use treatment. **Journal of substance abuse treatment**, Lexington, v. 25, n. 4, p. 249-256, 2003.

THOME, J. *et al.* Stress differentially regulates synaptophysin and synaptotagmin expression in hippocampus. **Biological psychiatry**, New Haven, v. 50, n. 10, p. 809-812, 2001.

TORRES, L. *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**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. e0136399, 2015a.

\_\_\_\_\_. Environmental tobacco smoke in the early postnatal period induces impairment in brain myelination. **Archives of toxicology**, Berlim, v. 89, n. 11, p. 2051-2058, 2015b.

\_\_\_\_\_. Exposure to tobacco smoke during the early postnatal period modifies receptors and enzymes of the endocannabinoid system in the brainstem and striatum in mice. **Toxicology Letters**, Wurzburg, v. 302, p. 35-41, 2019.

TOTH, Erika *et al.* Age-dependent effects of chronic stress on brain plasticity and depressive behavior. **Journal of neurochemistry**, New Jersey, v. 107, n. 2, p. 522-532, 2008.

VIEYRA-REYES, Patricia *et al.* Antidepressant-like effects of nicotine and transcranial magnetic stimulation in the olfactory bulbectomy rat model of depression. **Brain research bulletin**, Clifton, v. 77, n. 1, p. 13-18, 2008.

WALF, AA.; FRYE, C. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature protocols**, London, v. 2, n. 2, p. 322-328, 2007.

WEISBROD, Aaron S. *et al.* Decreased BDNF in female but not male rats after exposure to stress: a sex-sensitive rat model of stress?. **Stress**, London, v. 22, n. 5, p. 581-591, 2019.

WHITCOMB, B. *et al.* Cigarette smoking and risk of early natural menopause. **American journal of epidemiology**, Oxford, v. 187, n. 4, p. 696-704, 2017.

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

YANG, Yu *et al.* Behavioral and pharmacological investigation of anxiety and maternal responsiveness of postpartum female rats in a pup elevated plus maze. **Behavioural brain research**, College Station, v. 292, p. 414-427, 2015.

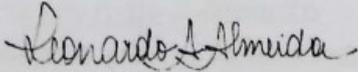
YALCIN, Ipek; BELZUNG, Catherine; SURGET, Alexandre. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. **Behavioural brain research**, College Station, v. 193, n. 1, p. 140-143, 2008.

YOON, S. *et al.* Chronic non-social stress affects depressive behaviors but not anxiety in mice. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, Seoul, v. 18, n. 3, p. 263-268, 2014.

YU, M. *et al.* Antidepressant-like effects and possible mechanisms of amantadine on cognitive and synaptic deficits in a rat model of chronic stress. **Stress**, London, v. 19, n. 1, p. 104-113, 2016.

ZARRINDAST, M. R.; SEDAGHATI, F.; BORZOUYEH, F. Nicotine-induced grooming: a possible dopaminergic and/or cholinergic mechanism. **Journal of Psychopharmacology**, London, v. 12, n. 4, p. 375-379, 1998.

## ANEXO – Certificado de aprovação pelo CEUA

	<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>														
<h3>CERTIFICADO</h3>														
<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;"> <tr> <td style="width: 40%;">Finalidade</td> <td>( ) Ensino                      (X) Pesquisa científica</td> </tr> <tr> <td>Vigência da autorização</td> <td>De 01/12/2018 a 30/11/2021</td> </tr> <tr> <td>Espécie/linhagem/raça</td> <td>Camundongo Swiss / heterogênico</td> </tr> <tr> <td>Nº de animais</td> <td>60 (10 machos e 50 fêmeas)</td> </tr> <tr> <td>Sexo</td> <td>Machos/Fêmeas</td> </tr> <tr> <td>Origem</td> <td>Biotério Central da UNIFAL</td> </tr> </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>Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida          Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG</p>														