UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM TOXICOLOGIA E ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

Efeitos da exposição à fumaça do cigarro com diferentes concentrações de nicotina nos elementos da transmissão sináptica no início do período pós-natal de camundongos

STEPHANIE DE OLIVEIRA DURO

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profª. Drª. Tania Marcourakis
Coorientadora: Profª Drª. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM TOXICOLOGIA E ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

Efeitos da exposição à fumaça do cigarro com diferentes concentrações de nicotina nos elementos da transmissão sináptica no início do período pós-natal de camundongos

STEPHANIE DE OLIVEIRA DURO

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre.

Departamento:

Análises Clínicas e Toxicológicas

Orientadora:

Profª. Drª. Tania Marcourakis

Coorientadora:

Profª Drª. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco

São Paulo

2017

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

D964e

Duro, Stephanie de Oliveira
Efeitos da exposição à fumaça do cigarro com diferentes concentrações de nicotina nos elementos da transmissão sináptica no início do período pós-natal de camundongos / Stephanie de Oliveira Duro. - São Paulo, 2017.
97 p. + Anexos

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Marcourakis, Tania
Coorientador: Pacheco, Larissa Helena Lobo Torres

1. Toxicologia. 2. Neurotransmissão. 3. Proteínas sinápticas. 4. Poluição tabagística ambiental. 5. C57/Bl6. I. T. II. Marcourakis, Tania, orientador. III. Pacheco, Larissa Helena Lobo Torres, coorientador.

Stephanie de Oliveira Duro

Efeitos da exposição à fumaça do cigarro com diferentes concentrações de nicotina nos elementos da transmissão sináptica no início do período pós-natal de camundongos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profª. Drª. Tania Marcourakis
orientadora/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

São Paulo, _____ de 2017.

AGRADECIMENTOS

À minha família, sem vocês o caminho percorrido teria sido mais difícil.

À Profª. Drª.Tania Marcourakis e à Profª. Drª Larissa Helena Lobo Torres Pacheco, pela orientação e paciência.

À Profª. Drª.Carolina Munhoz e Dr. Nilton, pela colaboração nos experimentos de imunofluorescência.

À Ms. Mariana Sayuri Berto Udo, muito obrigada pelo seu apoio, amizade e ajuda incondicional durante a pós-graduação, com você aprendi muitas coisas, dentre elas que o amigo verdadeiro é aquele que te diz o que você precisa ouvir na sua frente e que te defende nos momentos que você não está lá para se defender.

Ao Profº Dr. Raphael Caio Tamborelli Garcia, muito obrigada pela sua ajuda, sem seus palpites não conseguiria ter escrito minha dissertação.

À Drª Michelle Sercundes, agradeço a imensa ajuda nas análises da imunofluorescência.

À Ms. Ana Carolina Durão agradeço a ajuda nas perfusões e na carboxihemoglobina.

À Gabriela e Sarah, pela ajuda na determinação de nicotina e cotinina.

Aos meus amigos Lídia, Yuli, Vitor, Sara (IC), Andreza, Eric, Gustavo, Samantha e Nancy, vocês são a prova de que a amizade não precisa ser perfeita, mas sim verdadeira.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste projeto.

Resumo

DURO, S. O. **Efeitos da exposição à fumaça do cigarro com diferentes concentrações de nicotina nos elementos da transmissão sináptica no início do período pós-natal de camundongos.** 2017. 97f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O início do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) é caracterizado por diversos processos, com períodos críticos, que podem ser influenciados por xenobióticos. Este estudo teve como objetivo comparar os efeitos das diferentes concentrações de nicotina em elementos da transmissão sináptica durante o desenvolvimento de camundongos C57Bl/6. Para tanto, foram utilizados cigarros com duas diferentes concentrações de nicotina, o 3R4F (0,73 mg de nicotina/cigarro) e o 4A1 (0,16 mg de nicotina/cigarro). As exposições ocorreram diariamente a partir do 3° dia de vida (P3) até o 14° dia (P14) por duas horas, e os animais controle foram expostos somente ao ar sintético. Os animais foram eutanasiados em P15, P35 e P65 e avaliamos as seguintes proteínas: sinapsina (SYN1), sinaptotagmina (SYT), sinaptofisina (SYP), sinaptobrevina (SYB), PSD-95 e EGR-1, por *Western blottin*g; o gene *Egr-1* por PCR *Real Time;* MAP-2 e neurofilamentos (Neu) por imunofluorescência no hipocampo, tronco encefálico e cerebelo. Nossos resultados mostraram que na infância (P15) a fumaça do cigarro 3R4F diminuiu SYN1, assim como EGR-1, MAP-2 e Neu no cerebelo. No hipocampo houve aumento de SYN1 e MAP-2, diminuição de PSD-95, *Egr-1 e* Neu. No tronco encefálico esse cigarro não modificou nenhum dos parâmetros avaliados. Nessa mesma idade, a fumaça do cigarro 4A1 diminuiu MAP-2, Neu e a expressão gênica de *Egr-1* no cerebelo; diminuiu MAP-2 e Neu no hipocampo e não promoveu alterações no tronco encefálico. Em P35 (adolescência) o 3R4F manteve reduzido SYN1, EGR-1, MPA-2 and Neu, e também reduziu *Egr-1* no cerebelo. A diminuição de SYN1 também foi observada no hipocampo, mas nessa estrutura o 3R4F também aumentou SYT, SYP, MAP-2 and Neu; diminuiu EGR-1 e a expressão de *Egr-1*. No entanto, no tronco encefálico, foram observados aumento de SYN1 e MAP-2, e uma diminuição de Neu. Em relação

à fumaça do 4A1, em P35, nossos resultados mostraram diminuição de SYB, *Egr-1*, MAP-2 and Neu no cerebelo; aumento de *Egr-1*, MAP-2 e diminuição de Neu no hipocampo; no tronco encefálico houve aumento de SYB, *Egr-1*, Neu e diminuição de MAP-2. Na fase adulta (P65) as únicas diferenças estatísticas encontradas foram: no cerebelo: diminuição de SYB pelos cigarros 4A1, aumento de EGR-1 pelo 3R4F e aumento de *Egr-1* e MAP-2 por ambos os cigarros; no hipocampo: aumento de Neu por ambos os cigarros; tronco encefálico: aumento de SYB e EGR-1 e diminuição de SYT pelo 4A1, diminuição de SYN1, aumento de EGR-1, *Egr-1* e MAP-2 pelo 3R4F. Nossos resultados indicam que a exposição à fumaça do cigarro nos primeiros dias de vida de camundongos, mesmo que em baixas concentrações de nicotina, podem acarretar em alterações em elementos da transmissão sináptica em várias regiões encefálicas durante a infância, adolescência e na fase adulta.

Palavras-chave: Neurotransmissão, Proteínas sinápticas, Poluição tabagística ambiental, C57Bl/6.

Abstract

DURO, S. O. **Effects of environmental tobacco smoke with different concentrations of nicotine in synaptic elements in the postnatal period of mice.** 2017. 97f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The initial steps of the development of the central nervous system are characterized by several critical processes, which can be affected by xenobiotics. The present study aimed to compare the effect of two different nicotine concentrations in cigarettes on synaptic transmission elements during the development of C57/Bl6 mice. To reach this aim we exposed C57Bl/6 mice to smoke from two different cigarettes – 3R4F (0.73mg of nicotine/cigarette) or 4A1 (0.16mg of nicotine/cigarette), from the third day of life (P3) until the fourteenth (P14) for a period of 1h, twice a day (at 8am and at 3pm). The control animals were exposed only to synthetic air. At P15, P35 and P65, the animals were submitted to euthanasia and different encephalic areas were collected (cerebellum, hippocampus and brainstem); quantification of synapsin (SYN1), synaptotagmin (SYT), synaptophysin (SYP), synaptobrevin (SYB), PSD-95 and EGR1 protein expression was assessed by western blotting, gene expression of *Egr-1* by was assessed by RT-PCR and MAP-2 and neurofilaments (Neu) were assessed by immunofluorescence. Our results showed that exposure to 3R4F smoke decreased the quantification of SYN1 at infancy (P15), as well as EGR-1, MAP-2 and Neu at cerebellum. At hippocampus, there was an increase of SYN1 and MAP-2, decrease of PSD-95, *Egr-1* and Neu. At brainstem, 3R4F smoke did not modify any parameter. At the same age, 4A1 smoke decreased the quantification of MAP-2, Neu and the expression of *Egr-1*, at cerebellum; decreased MAP-2 and Neu at hippocampus and did not alter any parameter at brainstem. At P35 (adolescence) 3R4F smoke still reduced SYN1, EGR-1, MAP-2 and Neu, and reduced *Egr-1* at cerebellum. The reduction of SYN1 quantification was also observed at hippocampus, but at this area, 3R4F smoke also increased the quantification of SYT, SYP, MAP-2 and Neu and decreased EGR-1 and the expression of *Egr-1*. However, at the brainstem, an increased

quantification of SYN1 and MAP-2 and a decrease of Neu were observed. Regarding 4A1 smoke, at the same age, our results showed a decreased quantification of SYB, *Egr-1*, MAP-2 and Neu at cerebellum; increase of *Egr-1*, MAP-2 and decrease of Neu at hippocampus; and at brainstem, increase of SYB, *Egr-1*, Neu and decrease of MAP-2. At adulthood (P65) the only statistical differences were: at cerebellum – decreased quantification of SYB by 4A1 cigarette smoke, increase of EGR-1 by 3R4F and increase of *Egr-1* and MAP-2 by smoke of both cigarettes; at hippocampus – increase of Neu by smoke of both cigarettes; at brainstem – increase of SYB and EGR-1 and decrease of SYT by 4A1 smoke, decrease of SYN1, increase of EGR-1, *Egr-1* and MAP-2 by 3R4F smoke. Thus, we can conclude that exposure to cigarette smoke early in life, even at low nicotine concentrations can modify elements of synaptic transmission, compromising such transmission at several encephalic areas.

Keywords: Neurotransmission, synaptic proteins, secondhand smoke, C57Bl/6.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Receptor α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
CAM	Cellular adhesion molecule (molécula de adesão celular)
CE	Cerebelo
EGR	Early growth receptor (receptor de crescimento precoce)
FDA	Food and Drug Administration
HC	Hipocampo
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ISO	InternationalOrganization for Standardization
LTP	Long term potentiation (Potenciação de longa duração)
MAP-2	Microtubule associated protein (proteína associado ao microtúbulo 2)
Neu	Neurofilamentos
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fluoreto de fenilmetilsulfonil)
PSD	Postsynaptic density (densidade pós-sináptica)
PTA	Poluição Tabagística Ambiental
PVDF	Polyvinylidene fluoride(Fluoreto de polivinilideno)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato de sódio)
SNC	Sistema nervoso central
SYB	Sinaptobrevina
SYP	Sinaptofisina
SYN1	Sinapsina
SYT	Sinaptotagmina
TBS-T	Tris buffered saline-tween (tampão Tris-salina com Tween)
TRE	Tronco Encefálico

Sumário

1 INTRODUÇÃO..... 15
1.1 Epidemiologia do cigarro..... 15
1.2 Nicotina..... 17
1.2.1 Absorção..... 18
1.2.2 Biotransformação e eliminação..... 19
1.3 Desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC)..... 21
1.3.1 Proteínas pré-sinápticas envolvidas no ancoramento da vesícula pré-sináptica..... 27
1.3.2 Fator de transcrição EGR-1..... 29
1.3.3 Complexo prós-sináptico (PSD-95)..... 30
1.3.4 Proteína associada ao microtúbulo (MAP-2)..... 31
1.3.5 Neurofilamentos..... 32
1.4 Efeitos da nicotina no desenvolvimento do sistema nervoso central 32
2 OBJETIVOS..... 36
2.1 Estratégias experimentais..... 36
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 38
3.1 Animais..... 38
3.2 Exposição dos animais à fumaça do cigarro 3R4F ou 4A1 38
3.3 Desenho experimental 39
3.4 Determinação de carboxihemoglobia (COHb)..... 40
3.5 Determinação da concentração de nicotina e cotinina por UPLC-MS/MS..... 41
3.6 *Western Blotting*..... 42
3.7 PCR *Real time*..... 43
3.8 Imunofluorescência..... 44
3.9 Análise Estatística..... 45
4 RESULTADOS..... 46
4.1 Determinação de COHb e determinação de nicotina/cotinina do 3R4F e 4A1..... 47
4.2 Cerebelo..... 48
4.2.1 Análise de proteínas por *Western Blotting* e PCR *Real time*..... 49
4.2.2 Análise por imunofluorescência..... 56

4.3 Hipocampo..... 60
4.3.1 Análise de proteínas por *Western Blotting* e PCR *Real time*..... 61
4.3.2 Análise por imunofluorescência..... 68
4.4 Tronco encefálico..... 72
4.4.1 Análise de proteínas por *Western Blotting* e PCR *Real time*..... 73
4.4.2 Análise por imunofluorescência..... 80
5 Discussão..... 85
6 Conclusões..... 94
7 Referências Bibliográficas..... 95
Anexos..... 107

Lista de figuras

Figura 1:	Consumo oficial aparente de cigarros per capita no Brasil de 1980 a 2010	16
Figura 2:	Estrutura química da nicotina	17
Figura 3:	Fórmulas estruturais da (*S)*-nicotina e da (*R)*-nicotina	18
Figura 4:	Principais vias de biotransformação da nicotina	20
Figura 5:	Fechamento do tubo neural	22
Figura 6:	Representação de um cone de crescimento	24
Figura 7:	Sinaptogênese no SNC de uma sinapse glutamatérgica	26
Figura 8:	Ilustração de uma vesícula pré-sináptica	28
Figura 9:	Câmara de exposição à fumaça do cigarro	39
Figura 10:	Análise quantitativa de sinapsina por *Western Blotting* no cerebelo de animais expostos a fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias	49
Figura 11:	Análise quantitativa de sinaptotagmina por *Western Blotting* no cerebelo de animais expostos a fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias	50
Figura 12:	Análise quantitativa de sinaptofisina por *Western Blotting* no cerebelo de animais expostos a fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias	51
Figura 13:	Análise quantitativa de sinaptobrevina por *Western Blotting* no cerebelo de animais expostos a fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias	52
Figura 14:	Análise quantitativa de PSD-95 por *Western Blotting* no cerebelo de animais expostos a fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias	53
Figura 15:	Análise quantitativa de EGR-1 por *Western Blotting* no cerebelo de animais expostos a fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias	54
Figura 16:	Análise quantitativa do gene *Egr-1* por PCR *Real time* no cerebelo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	55
Figura 17:	Fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e neurofilamentos, em animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F.	56
Figura 18:	Fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e neurofilamentos, em animais expostos à fumaça do cigarro 4A1.	57
Figura 19:	Análise quantitativa da MAP-2 no cerebelo.	58
Figura 20:	Análise quantitativa dos neurofilamentos no cerebelo.	59
Figura 21:	Análise quantitativa de sinapsina por *Western Blotting* no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	61
Figura 22:	Análise quantitativa de sinaptotagmina por *Western Blotting* no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	62
Figura 23:	Análise quantitativa de sinaptofisina por *Western Blotting* no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	63
Figura 24:	Análise quantitativa de sinaptobrevina por *Western Blotting* no	64

	hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	
Figura 25:	Análise quantitativa de PSD-95 por *Western Blotting* no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	65
Figura 26:	Análise quantitativa de EGR-1 por *Western Blotting* no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	66
Figura 27:	Análise quantitativa do gene *Egr-1* por PCR *Real time* no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	67
Figura 28:	Fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e neurofilamentos, em animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F.	68
Figura 29:	Fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e neurofilamentos, em animais expostos à fumaça do cigarro 4A1.	69
Figura 30:	Análise quantitativa da MAP-2 no hipocampo.	70
Figura 31:	Análise quantitativa dos neurofilamentos no hipocampo.	71
Figura 32:	Análise quantitativa de sinapsina por *Western Blotting* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	72
Figura 33:	Análise quantitativa de sinaptotagmina por *Western Blotting* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	73
Figura 34:	Análise quantitativa de sinaptofisina por *Western Blotting* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	74
Figura 35:	Análise quantitativa de sinaptobrevina por *Western Blotting* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	75
Figura 36	**:** Análise quantitativa de PSD-95 por *Western Blotting* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	76
Figura 37:	Análise quantitativa de EGR-1 por *Western Blotting* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	77
Figura 38:	Análise quantitativa do gene *Egr-1* por PCR *Real time* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1.	78
Figura 39:	Fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e neurofilamentos, em animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F.	79
Figura 40:	Fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e neurofilamentos, em animais expostos à fumaça do cigarro 4A1.	81
Figura 41:	Análise quantitativa da MAP-2 no tronco encefálico.	82
Figura 42:	Análise quantitativa dos neurofilamentos no tronco encefálico.	83

Lista de tabelas

Tabela 1:	Alterações genéticas da fração CYP2A6 em relação ao consumo do tabaco	21
Tabela 2:	Representação de proteínas e seus respectivos anticorpos	41
Tabela 3:	Valores de porcentagem de carboxihemoglobina dos animais expostos ou não (controle) à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias consecutivos	46
Tabela 4:	Valores de nicotina/cotinina dos animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias consecutivos.	46
Tabela 5:	Resumo dos resultados obtidos nas análises de *Western Blotting*, PCR *Real time* e Imunofluorescência	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do cigarro

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o uso do tabaco como uma epidemia, que leva à morte de aproximadamente seis milhões de pessoas ao ano, sendo que 600.000 destas referem-se às pessoas expostas ao fumo passivo (OMS, 2014).

O fumante passivo é exposto à poluição tabagística ambiental (PTA), que é composta por duas correntes de fumaça: primária e secundária, também conhecidas como fumaça central e lateral, respectivamente. A corrente primária, ou fumaça central, é a corrente tragada e absorvida pelo fumante. Esta produz aproximadamente 7.000 substâncias tóxicas ao organismo, das quais 43 são cancerígenas, e sua temperatura de queima pode chegar à aproximadamente 900 °C (COUTO, CAMPELO, 2009).

A principal responsável pela poluição tabagística ambiental é a corrente secundária, ou fumaça lateral, que é composta pela fumaça que sai da ponta do cigarro acesso, onde a temperatura atingida é de aproximadamente 350°C. Nesta temperatura ocorre uma combustão incompleta dos compostos o que gera várias substâncias tóxicas em quantidades iguais ou maiores as da corrente primária, como o triplo da quantidade de nicotina, o triplo de CO_2, o quíntuplo de alcatrão e 50 vezes mais substâncias cancerígenas (INCA, 2014).

Vários estudos epidemiológicos associam as exposições tabagísticas ambientais em fases precoces da vida (intrauterina e infância) com consequências na saúde na vida adulta, inclusive com o surgimento de câncer (BOFFETTA *et al*., 2000; BARTON *et al.*, 2005; ASOMANING, *et al*., 2008). A exposição à PTA no início da vida intrauterina pode induzir processos deletérios no feto por causa da condução de substâncias tóxicas pelo cordão umbilical tanto em gestantes fumantes quanto em gestantes expostas ao fumo passivo (WÜNSCH FILHO *et al.*, 2010).

Estudos mostram que o ato de fumar durante a gravidez é responsável por 20% dos casos de fetos com baixo peso ao nascerem, 8% dos partos prematuros e 5% de todas as mortes perinatais, além de contribuir para a síndrome da morte súbita infantil e de causar alterações importantes no

desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) do feto (LEOPERCIO *et al*., 2003; GALÃO *et al.,* 2009).

Nos recém-nascidos, o tabagismo passivo está relacionado a déficits neurológicos e cognitivos, tremores, hipertonicidade, inquietude e hiperatividade. Já a criança no período pré-escolar exposta ao fumo passivo apresenta prejuízos no aprendizado, déficit de atenção, dificuldades na leitura, em cálculo, no desenvolvimento de habilidades manuais e ainda da linguagem falada (REICHERT *et al.*, 2008).

Pesquisas recentes mostram que o consumo do cigarro foi reduzido no Brasil (Figura 1) em função de diversas campanhas anti-tabagísticas. Um exemplo é a Lei nº 12.546 de dezembro de 2011, a qual proíbe o ato de fumar em recintos coletivos fechados, privados ou públicos, de todo o país. Esta lei representa um avanço significativo na Política Nacional de Controle do Tabaco, passando a garantir proteção à população contra os danos à saúde decorrentes da exposição à fumaça ambiental do tabaco (INCA, 2014).

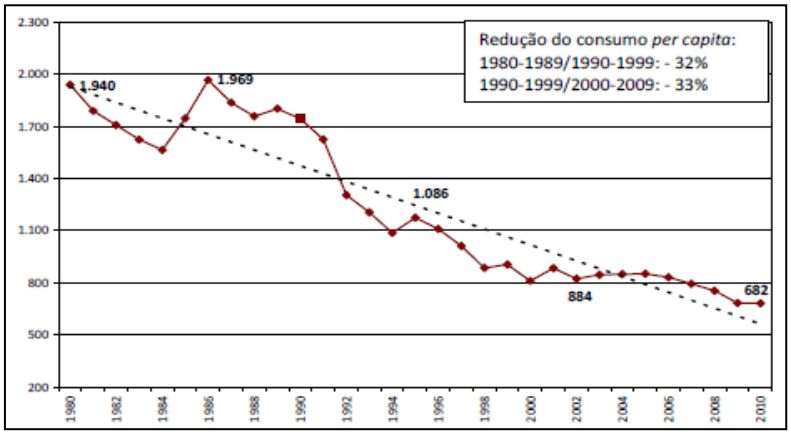


Figura 1: Consumo oficial aparente de cigarros per capita no Brasil de 1980 a 2010 (INCA, 2014).

A nicotina é uma das 4.200 substâncias catalogadas que compõem o cigarro e está fortemente relacionada à dependência dos indivíduos fumantes. Os cigarros com maior concentração deste alcaloide foram caracterizados como os maiores responsáveis por este efeito, sugerindo que quanto maior a concentração de nicotina mais dependente o indivíduo se tornaria. Por isso, no final dos anos 80 as indústrias de tabaco, por imposição do FDA, começaram a

fabricar cigarros com baixo teor desta substância em uma tentativa de “reduzir” o quadro de dependência. Estes cigarros foram erroneamente caracterizados como “menos perigosos”, pois a nicotina ainda está presente na composição, levando o fumante a fumar mais cigarros por dia para compensar a redução da concentração desta (DUNSBY *et al*. ,2004).

O impacto desta redução ainda permanece controverso, pois sabemos que na composição do cigarro existem várias outras substâncias também capazes de causar danos à saúde, como o benzeno, o níquel, o cianeto, o formaldeído, a amônia e as n-nitrosaminas, que são cancerígenas (VALAVANIDIS *et al*., 2009).

1.2 Nicotina

A nicotina é um alcaloide vegetal encontrado nas folhas mais altas e áreas próximas ao talo da planta *Nicotiana*sp. Existem várias espécies de *Nicotiana*, sendo as mais conhecidas a *Nicotiana tabacum* (popularmente conhecida como tabaco) e a *Nicotiana rústica* (popularmente conhecida como mapacho) (ROSEMBERG, 2004; BALBINI, 2005).

Este alcaloide é constituído de uma amina terciária derivada de piridina e de um anel de pirrolidina (Figura 2).Durante a queima do cigarro, em temperaturas de aproximadamente 900ºC, duas formas racêmicas estereoisômeras se formam:a (S)-nicotina e a (R)-nicotina(Figura 3). A primeira ((S)- Nicotina) é farmacologicamente 100 vezes mais ativa do que a segunda e representa 90% do total de nicotina absorvida pelo usuário (BENOWITZ, 2009).

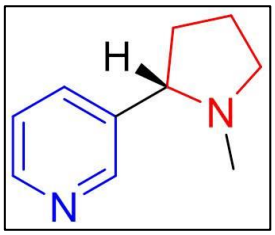


Figura 2: Estrutura química da nicotina. O anel de piridina está em azul e o de pirrolina em vermelho (Adaptado de NCBI, 2017).

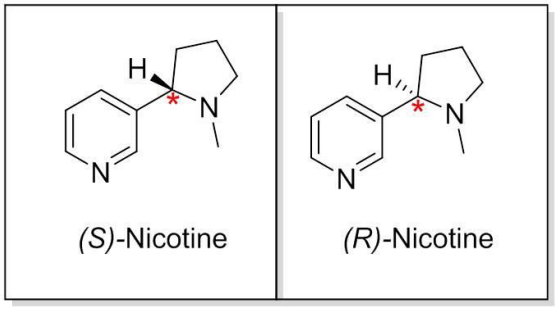


Figura 3: Fórmulas estruturais da (*S*)-nicotina e da (*R*)-nicotina (Adaptado de NCBI, 2017).

1.2.1 Absorção

A nicotina é um composto dibásico, cuja absorção ocorre prontamente na mucosa oral, pulmões, pele ou pelo trato digestório, mais especificamente no intestino, e dependerá do pH do meio (LANGONE, GJIKA, VAN VUNAKIS , 1973).

O aumento do pH do meio aumenta a concentração das frações lipofílicas sem cargas, podendo assim, atravessar ativamente as membranas biológicas (MISHRA, 2015). O cigarro tem caráter ácido (pH 5,5), fazendo com que a nicotina se encontre na forma ionizada e não seja permeável às membranas biológicas, assim, a absorção pela mucosa oral não ocorre facilmente.Quando a fumaça do cigarro atinge o pulmão a nicotina é então rapidamente absorvida devido à grande superfície de contato dos alvéolos e dos bronquíolos e o fato destas regiões conterem muco com pH em torno de 7,4, favorecendo a dissolução da nicotina, que permanece em maior proporção em sua forma molecular (TUTKA, 2005; OGA, 2008).

A nicotina, ao atravessar as membranas biológicas, atinge rapidamente um pico máximo de aproximadamente 10ng/ml, durante a tragada e chega a corrente sanguínea de 5 a 10 minutospor difusão passiva, alcançando o SNC entre 10-20 segundos, por transporte ativo (BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB, 2009; ROSEMBERG,2004).

O ato de fumar é um processo complexo e diversos parâmetros irão determinar o quanto de nicotina o fumante terá circulante em seu organismo. Entre esses parâmetros destacamos as características da exposição como volume, frequência, intensidade da tragada, temperatura de queima do cigarro, bem como a quantidade de fumaça inalada e dispersa no ambiente, além das

características de fabricação, como composição do cigarro, do filtro e do papel (USDHHS, 2001; TUTKA, 2005).

1.2.2 Biotransformação e eliminação

A composição do cigarro e as suas características de fabricação, assim como a fisiologia do usuário e o padrão de uso podem afetar a concentração dos produtos de biotransformação da nicotina, como a cotinina e a óxido-N-nicotina, assim como a velocidade com que estas se formam e são eliminadas (USDHHS, 2001).

No fígado, a biotransformação da nicotina é catalisada pelo citocromo P450, sendo a enzima CYP2A6 a principal responsável pela reação. Primeiramente, a nicotina é convertida a íon de nicotina-imínio e este pode ser um dos principais responsáveis pelas alterações que ocorrem no tecido pulmonar, pois, por ser um agente alquilante, este pode se ligar ao DNA e gerar mutações no tecido (SHIGENAGA, TREVOR, CASTAGNOLI, 1988; BYRD, 1998; ST. CHARLES *et al*, 2006). A segunda etapa consiste na biotransformação deste íon em cotinina pela enzima citosólica aldeído oxidase (SHIGENAGA , TREVOR , CASTAGNOLI, 1988).

Há ainda duas vias de biotransformação não oxidativas da nicotina: a metilação do nitrogênio da piridina, que resulta no íon nicotina isometônio e, a via da glicuronidação. Por meio da glicuronidação a nicotina é biotransformada em glicuronídeo N-quaternário, catalisado pela enzima uridina difosfato-glucuronosiltransferase (UGT) que produz a (S)-nicotina-Nβ-glicuronídeo (cerca de 3-5% da nicotina) (HUKKANEN; JACOB; BENOWITZ, 2005). A Figura 4 ilustra as principais vias de biotransformação da nicotina.

Apesar de a nicotina ser considerada um indicador de exposição ao tabaco, sua meia vida é de apenas duas horas, tornando a diferenciação do indivíduo fumante ativo e passivo mais difícil, pois em ambos os casos a concentração de nicotina será constante e diretamente proporcional à quantidade de tabaco que este é exposto. Desse modo, a cotinina tem sido considerada um bom indicador para caracterizar essa diferença, tendo em vista que esta pode durar de 36 a 40 horas, podendo ainda se estender por mais tempo (ROSEMBERG, 2004).

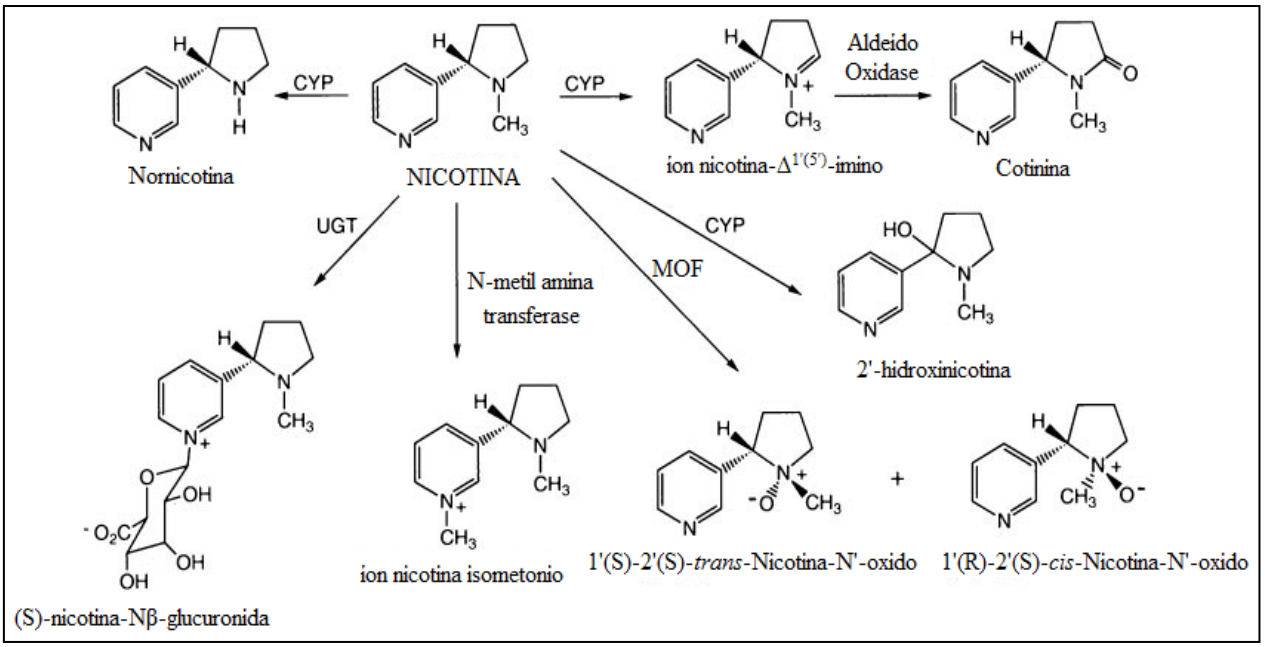


Figura 4: Principais vias de biotransformação da nicotina. CYP – Enzima citocromo P450; UGT - enzima uridina difosfato-glucuronosiltransferase; MOF – Monooxidase contendo Flavina (Adaptado de HUKKANEN; JACOB; BENOWITZ, 2005).

A identificação da cotinina na urina é possível mesmo que o indivíduo tenha fumado dois dias antes da detecção, havendo uma recuperação de até 90% da cotinina secretada. Nos rins, a cotinina é biotransformada em trans-3'-hidroxicotinina (34%) pela CYP2A5(90% da biotransformação da cotinina) e glicuronídeo de nicotina (13%) pelo ácido glicurônico (ROSEMBERG, 2004).

Evidências sugerem que variações na sequência genética da enzima CYP2A6, definam a velocidade e a capacidade do indivíduo em biotransformar a nicotina e, consequentemente, isto influencie no comportamento de uso, ou seja, o indivíduo que biotransforma mais rapidamente em cotinina (alta atividade da CYP2A6) terá menos nicotina circulante, logo irá fumar mais cigarros, como mostra a Tabela 1 (LEWIS *et al*, 1999).

Tabela 1: Alterações genéticas da fração CYP2A6 em relação ao consumo do tabaco

Genotipagem da fração CYP2A6	Consumo de tabaco
Homozigóticos	Alto consumo; biotransformação de 80% da nicotina; e alto potencial de dependência.
Heterozigóticos	Baixo consumo; biotransformação de 5% a 50% da nicotina; menor potencial de dependência.

(Fonte: ROSEMBERG, 2004)

A eliminação renal da nicotina ocorre pela filtração glomerular e secreção tubular, sendo esta última pH dependente. Quando a urina se torna ácida, cerca de 23% da nicotina é excretada, já que há predomínio de sua forma ionizada, fazendo com que a reabsorção tubular seja mínima, ou seja, quando o pH urinário é maior que 7 a excreção de nicotina cai (BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB, 2009).

O fumo associado à ingestão de álcool aumenta a eliminação da nicotina, pois o pH urinário se modifica, acidificando-se. Por essa razão os nicotino-dependentes, quando ingerem álcool, têm maior necessidade de consumo de cigarros (ROSEMBERG, 2004).

Alguns autores sugerem que o uso de aditivos do cigarro como a amônia, pode propiciar o aumento do pH durante a queima, aumentando a absorção de nicotina do fumante (PANKOW *et al*, 2003; RABINOFF *et al*, 2009; WERTZ *et al*, 2011). Antigamente as indústrias adicionavam a amônia e outros aditivos, como o fosfato de diamônia (DAP), a ureia, a amônia pura e até o hidróxido de amônia, entretanto outros estudos indicam que o uso destes aditivos não acarreta no aumento da concentração de nicotina na corrente sanguínea (PANKOW *et al*, 2003; RABINOFF *et al*, 2009; WERTZ *et al*, 2011).

1.3 Desenvolvimento do sistema nervoso central

O desenvolvimento do SNC se origina a partir do espessamento da ectoderma. As células, ao longo do dorso do embrião, se diferenciam pela indução da notocorda e do mesoderma paraxial, para a formação da placa neural. Gradativamente, a placa neural cresce e adquire a forma de um sulco, que se aprofunda, denominado de sulco neural. A partir da quarta semana do desenvolvimento, com o dobramento das pregas do sulco neural, ocorre a neurulação, quando há a formação do tubo neural. Algumas células neuroectodérmicas migram dorsalmente para cada extremidade do tubo, constituindo lâminas longitudinais dando origem à crista neural. Deste modo, é aceitável estabelecer que o SNC seja formado a partir do tubo neural e que a crista neural origina a maior parte do sistema nervoso periférico (LENT, 2010; BATISTA *et al*., 2004). A formação do tubo neural ocorre, em humanos, entre os dias 24-28 de gestação e nos roedores, entre os dias 9-9,5 (camundongos) ou 10,5-11 (ratos) (SEMPLE *et al*., 2013). A Figura 5 ilustra este fenômeno.

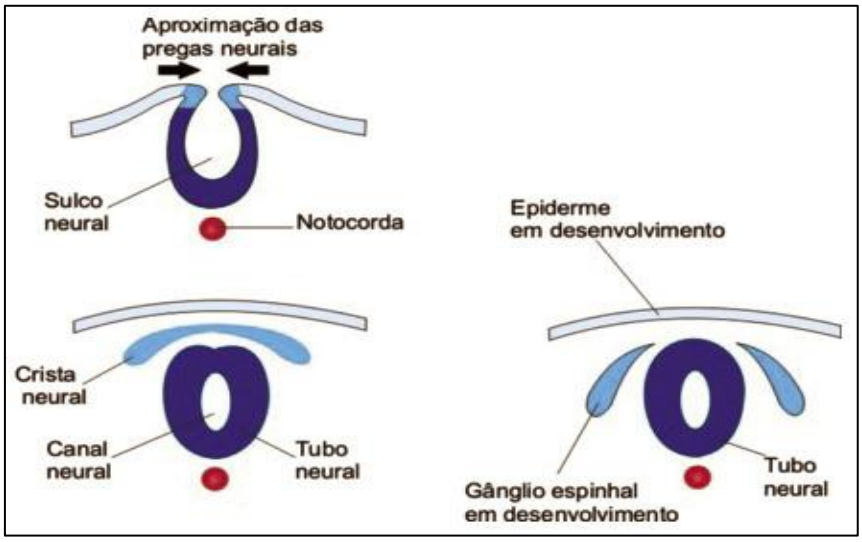


Figura 5: Fechamento do tubo neural (Adaptado de MOORE *et al*., 2003).

Em roedores durante o desenvolvimento do SNC, as estruturas se encontram em diferentes estágios de maturação. A migração celular e a neurogênese ocorrem durante a segunda semana e juntamente com estes fenômenos temos vários outros que são também muito importantes durante o desenvolvimento, como a sinaptogênese, a diferenciação, a apoptose e a mielinização (RICE; BARONE, 2000).

Nas primeiras duas semanas pós-natais é possível observar, no cerebelo, as diferentes migrações e conexões que as células realizam durante este processo. Os movimentos saltatórios, a transição de fases estacionárias, a interação célula-célula e a degradação da matriz celular são processos que marcam o início da migração das células granulares e em cesto tanto para regiões mais superficiais (granulares) quanto para as regiões mais internalizadas (em cesto). Há ainda fatores reguladores, tanto para estimular, quanto para inibir esta migração, como os neuropeptídios (PACAP- polipeptídio ativador de adenilato ciclase da hipófise) e proteínas como IGF-1 (fator de crescimento de insulina-1). Exposições a xenobióticos durante esta migração pode alterar a conformação celular e levar a distúrbios no cerebelo (GALAS *et al.* , 2017; MIALE; SIDMAN, 1961).

A formação do hipocampo ocorre no período pré-natal e se inicia com o dobramento da região da zona medial da placa cortical, que posteriormente irá formar a região das células piramidais e ainda a região do giro denteado. O giro denteado exibe proliferação pós-natal contínua de células granulares tanto em roedores quanto em humanos (RICE; BARONE, 2000).

Durante a formação do giro denteado, por volta do 21º dia embrionário, as células granulares que se encontram na região mais interna do giro migram de modo progressivo para a região lateral. A diferenciação destas células granulares é dada pela transformação polimórfica, ou seja, por diferenças na morfologia das células. O escurecimento das células ao redor da diferenciação, o clareamento de células granulares, é dada da mesma forma tanto na parte interna, quanto externa do giro (ORR *et al.,* 2016*;* ALTMAN; BAYER, 1990).

O tronco encefálico também é formado durante o período pré-natal e este período coincide com a formação craniofacial em roedores (RICE; BARONE, 2000). O desenvolvimento do tronco encefálico se inicia através da migração celular na ponte e na medula, que ocorre de forma direta e indireta na zona germinativa, que é caracterizada pelo conjunto de células formadas durante a formação do embrião. Estas células irão posteriormente formar as regiões motora e sensorial do tronco, e suas posições são determinadas em relação à linha média do embrião e de acordo com a zona ventricular, esta zona possui alta neurogênese durante o desenvolvimento (YACHNIS; RORKE, 2016).

A diferenciação neuronal está ligada a migração celular e através deste processo há também o surgimento dos primeiros circuitos neurais, estes são dependentes da sinaptogênese, processo caracterizado como sendo o período de criação das primeiras sinapses do SNC durante a sua formação.

Durante o desenvolvimento, há refinamento das ligações neuronais tais como a comunicação do axônio com o dendrito, para estabelecer as primeiras sinapses, sendo que este contato pode ser iniciado pelo crescimento de cones de crescimento (Figura 6). Os cones são responsáveis por explorar o microambiante em que se encontram, determinando o direcionamento do crescimento axonal. Este evento envolve vários elementos como receptores (NMDA, por exemplo), moléculas de sinalização (Wnt, por exemplo) e moléculas de adesão, que são especializadas no reconhecimento célula-célula (CAM's), induzindo sinais químicos para os estágios iniciais da formação da sinapse. Tais elementos tornarão os primeiros neurônios aptos a formar sinapses (WAITES *et al.*, 2005).

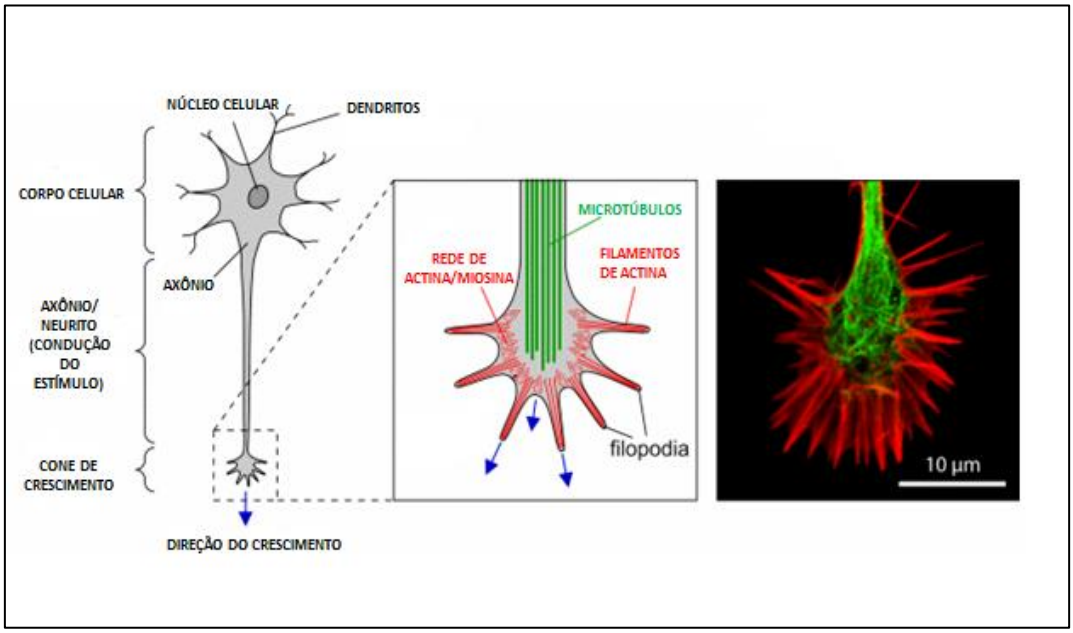


Figura 6: Representação de um cone de crescimento. Destaca-se a direção em que ocorre o crescimento do futuro axônio (Adaptado de PAWLIZAK, 2009).

Nos mamíferos, durante o período do desenvolvimento neural, as sinapses se dão de forma assimétrica em locais onde há a adesão célula-célula. Estas junções sinápticas possuem três regiões: o botão pré-sináptico, a fenda sináptica e a região pós-sináptica. Os botões pré-sinápticos são

encontrados ao longo dos axônios ou em suas extremidades os quais são preenchidos por vesículas pré-sinápticas (GARNER *et al.*, 2002).

Logo após a diferenciação neuronal e o processo de formação de axônios e dendritos, muitos genes que são responsáveis pela codificação das proteínas sinápticas, estão também ligados à formação, ao acúmulo, e ao direcionamento do tráfico de vesículas que transportam complexos de proteína pré e pós-sinápticos (WAITES et al., 2005).

Estas vesículas ancoram na membrana pré-sináptica, se fundem a ela e por fim, liberam o neuromediador contido em seu interior. O local de liberação do neuromediador é chamado de zona ativa. Estudos que investigam a formação das primeiras vesículas pré-sinápticas identificaram que 50 ou mais proteínas pré-sinápticas são transportadas para terminais nervosos em vesículas precursoras. Estas, por sua vez, são recicladas no citoplasma da membrana por endossomas e amadurecem formando novas vesículas aptas para a neurotransmissão (ZHAI *et al.*, 2001; HANNAH *et al.*, 1999).

A biogênese das vesículas precursoras aparentemente ocorre no complexo de Golgi. Cada precursor de vesícula pré-sináptica é composto por diferentes proteínas pré-sinápticas. Assim, em uma vesícula, podemos encontrar sinaptofisina e sinaptotagmina e em outra vesícula encontramos sinaptobrevina-2. Quando estão maduras estas vesículas estão prontas para serem preenchidas pelo neuromediador. Antes de ocorrer a sinaptogênese, a fusão destas vesículas se dá de forma irregular em locais não especializados na transmissão, levando à liberação do transmissor ao longo de todo o cone de crescimento. Quando há a sinaptogênese a fusão da vesícula sináptica está restrita à zona ativa (SLEPNEV *et al.,* 2001; HANNAH *et al.*,1999).

Vários estudos têm demonstrado que os sítios pré-sinápticos podem se formar rapidamente em menos de 30 minutos após o contato inicial com a região axo-dendrítica. Isso é condizente com a teoria de que a formação dos sítios de liberação do neuromediador acontece logo após a fusão dos precursores das vesículas pré-sinápticas na zona ativa primitiva, sendo que estas vesículas possuem, em humanos, 80 nm de densidade. Aparentemente, a fusão das vesículas com a membrana pré-sináptica é acompanhada pela deposição de componentes proteicos na fenda sináptica que está em formação. Tal fusão pode influenciar ou direcionar a formação sináptica, bem

como diferenciar o ancoramento pré-sináptico e o recebimento do neuromediador na região pós-sináptica, como mostra a Figura 7 (ZHAI *et al.*, 2001; GARNER *et al.*, 2002; FERNÁNDEZ; COLLINS; UREN, 2009).

A região pós-sináptica encontra-se justaposta à zona ativa e está localizada na membrana pós-sináptica. Essa região pode ser identificada pela presença das proteínas PSD's (*Post Synaptic Density*). As PSD's estão diretamente envolvidas no agrupamento e na ancoragem dos receptores pós-sinápticos e canais de íons de alta densidade (SCANNEVIN *et al.*, 2000; SHENG *et al.*, 2001). As PSD's são conhecidas como uma zona elétron-densa, ou seja, possuem alta densidade de elétrons. Sua composição abrange centenas de proteínas incluindo receptores do tipo NMDA, AMPA, receptores metabotrópicos de glutamato, proteínas de sinalização celular, enzimas, componentes do citoesqueleto e canais iônicos. As centenas de componentes da PSD se associam por uma série de interações proteicas, o que classifica a PSD como uma das proteínas mais complexas da formação sináptica (MERLO *et al.*, 2011).

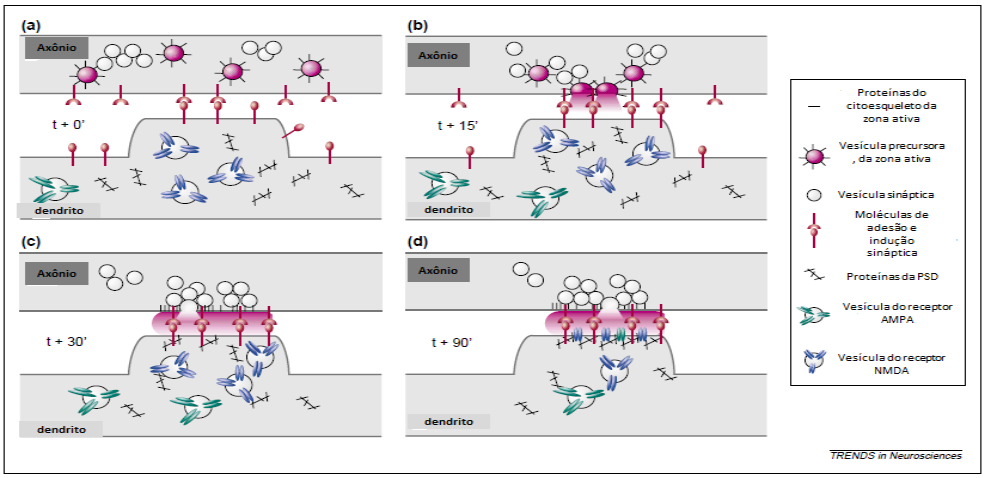


Figura 7: Sinaptogênese no SNC de uma sinapse glutamatérgica. É um processo de múltiplos passos iniciado logo após o contato inicial axo-dendrítica. (a) O primeiro passo envolve a ativação de moléculas de adesão celular "clássicas" (CAMs), tais como as caderinas. (b) Vesículas pleomórficas se agrupam nos sítios pré e pós-sinápticos do contato estabelecido célula-célula. O número e o tipo de vesículas que participam destes estágios iniciais é desconhecido. Estes podem fornecer não só proteínas estruturais pré-sinápticas, mas também proteínas responsáveis pela fusão exocitótica. (c) O núcleo elétron-denso de 80 nm das vesículas sugere que este pode expressar fatores sinaptogênicos que ajudam a impulsionar a diferenciação pós-sináptica. (d) Diferenciação da célula pós-sináptica parece ocorrer pelo recrutamento de moléculas precursoras da PSD seguido de receptores de glutamato e moléculas sinalizadoras da PSD. Os pontos de tempo (t) representam o curso de tempo aproximado destes processos em minutos após o contato axo-dendrítico (Adaptado de GARNER *et al.*, 2002).

Durante a diferenciação dos elementos pós-sinápticos um dos primeiros eventos que ocorre é o recrutamento das proteínas da família PSD-95. Estas estão presentes nas sinapses no segundo dia pós-natal no hipocampo e são detectadas após 20 minutos do primeiro contato axo-dendrítico. Alguns pesquisadores como Prange e Murphy (2001) observaram que o transporte de PSD-95 durante a sinaptogênese ocorre por meio de aglomerados de proteínas, enquanto outros observaram que o acúmulo de PSD-95 ocorre de maneira gradual e não em forma de aglomerados (TAFT; TURRIGIANO, 2014; KIM *et al*., 2007). O acúmulo gradual de PSD-95 pode ocorrer pelo aprisionamento dos agrupamentos destas proteínas na membrana plasmática ou por fusão das vesículas na membrana, sendo que cada uma destas vesículas transporta uma pequena quantidade de PSD-95 (WAITES *et al*., 2005).

1.3.1 Proteínas pré-sinápticas envolvidas no ancoramento da vesícula pré-sináptica

O processo de ancoramento das vesículas pré-sinápticas na membrana plasmática, no botão pré-sináptico, assim como sua reciclagem, é orquestrado por diversas proteínas e complexos proteicos. Dentre as principais proteínas podemos citar a sinaptofisina, sinaptotagmina e sinapsina, e o complexo PSD-95.

Durante o período do desenvolvimento do SNC, a sinaptofisina está localizada na região distal do axônio e no cone de crescimento, antes do contato estabelecido entre célula-célula (FLETCHER, 1991). A sinaptofisina foi uma das primeiras proteínas pré-sinápticas a ser identificada, entretanto, seu papel bioquímico na vesícula permanece incerto. Alguns estudos têm demonstrado seus efeitos no desenvolvimento da memória e na endocitose das vesículas sinápticas, sugerindo que esta proteína possa desempenhar um papel importante no ciclo destas vesículas (ADAMS *et al.*, 2015).

A sinaptofisina é uma glicoproteína da membrana, cujo peso molecular é de 38 kDa, e contém quatro domínios transmembranares. Por ser uma proteína localizada exclusivamente nas vesículas sinápticas, ela é utilizada como marcador de terminais pré-sinápticos (KNOW *et al*., 2011). A fosforilação da

desta proteína sugere que ela auxilie na liberação das vesículas sinápticas do citoesqueleto, permitindo a migração da vesícula para a fusão com a membrana plasmática (BENFENATI *et al.,* 1989; PIERIBONE *et al.,* 1995 SÜDHOF *et al.,* 2004; FERREIRA, 2006). A Figura 8 ilustra a disposição das proteínas na vesícula sináptica.

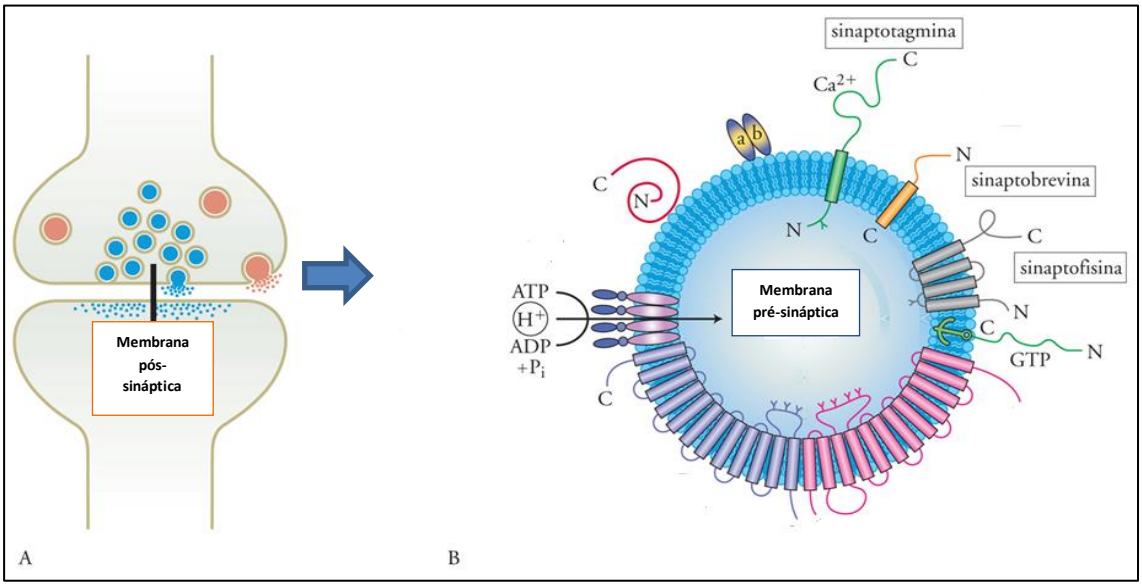


Figura 8: Ilustração de uma vesícula pré-sináptica. Pode-se observar onde estão dispostas as proteínas pré-sinápticas como sinaptofisinas, sinaptotagminas e sinaptobrevina. (Adaptado de BENFENATI *et al*., 2007).

A Sinaptobrevina-2 (ou VAMP-2), principal proteína SNARE (*SNAP receptors, SNAP-Synaptossome Associated Proteins*) das vesículas sinápticas, é necessária para que haja uma rápida exocitose das vesículas sinápticas em sinapses que utilizam cálcio como sinalizador (DEÁK, 2004). Bacci *et al*. (2001) demonstraram que o bloqueio crônico de receptores de glutamato provoca a diminuição do complexo sinaptobrevina/sinaptofisina e indicaram que a sinaptofisina atua na regulação da disponibilidade de sinaptobrevina, e consequentemente, na exocitose das vesículas sinápticas. Becher *et al.* (1999) relataram que o complexo sinaptobrevina/sinaptofisina apresenta supersensibilidade durante o desenvolvimento do SNC. Contudo, estes estudos demonstraram que, mesmo com a disponibilidade de ambas as proteínas na vesícula sináptica, a interação destas proteínas só ocorre após o início do processo de sinaptogênese.

Berton *et al.* (1997) determinaram por meio de hibridização *in situ*, que no SNC em desenvolvimento, a expressão das subunidades de sinaptotagmina I, II, III e IV são distintas, sendo que quando analisamos células granulares do cerebelo, as quatro subunidades foram detectadas durante a formação da fibra paralela e na formação das sinapses desta fibra com as células de Purkinje. Durante o desenvolvimento, a sinaptotagmina II foi mais expressa na medula espinhal. Em relação às sinaptotagminas I, II e III, foi constatado que estas aumentaram sua expressão de forma gradativa durante o período de desenvolvimento e de acordo com a diferenciação neuronal, e que esta expressão se estende até a fase adulta (BERTON *et al*.,1997).

As sinaptotagminas são proteínas amplamente distribuídas, encontradas em tecidos nervosos e não nervosos. As proteínas do sistema nervoso possuem uma porção N-terminal dentro da vesícula pré-sináptica, um segmento transmenbranar e um segmento extra-vesicular que se conecta à dois domínios C2, citoplasmáticos, ligantes de cálcio. Esses domínios interagem com fosfolipídios e com o complexo SNARE de maneira cálcio dependente e são essenciais para a fusão das membranas (vesicular e plasmática) (ARISI; NEDER; MOREIRA, 2001; LEE; LITTLETON, 2010).

1.3.2 Fator de transcrição EGR-1

O fator de transcrição nuclear responsável pelo crescimento precoce, o EGR-1, também conhecido como NGFI-A, krox24, zif 268 e tis 8, é uma proteína que se liga ao DNA nuclear e reconhece especificamente a sequência 5`-GCGKGGGCG-3 e foi identificado como um modulador importante em diversos tipos celulares (CASTILLO *et al.*, 2003).

Este gene desempenha um papel importante no SNC, onde é amplamente expresso em animais adultos e em desenvolvimento. Dentre suas atribuições podemos citar a proliferação, a diferenciação e seu envolvimento nas vias de morte celular (MCCAFFREY *et al.*, 2000).

Há poucos trabalhos que citam os sítios de ligação para o EGR-1, entretanto, análises realizadas nas regiões que codificam as proteínas de vesículas sinápticas mostraram que este gene está ligado aos genes promotores de sinapsina I, sinaptobrevina II e sinaptofisina. Esses dados

sugerem que este fator de transcrição nuclear pode estar envolvido na plasticidade sináptica (THIEL *et al.*, 1994).

Segundo Thiel *et al.* (1994), as alterações na plasticidade em longo prazo podem incluir mudanças na expressão de genes que codificam neurotransmissores, neuromoduladores, receptores, canais iônicos, proteínas estruturais e regulatórias de mielina e sinapse, proteínas de vesícula sináptica, e fatores neurotróficos. Os promotores que contêm sítios de ligação e de transcrição ativos para EGR-1 incluem aqueles da timidina quinase, o fator de necrose tumoral, ambas as cadeias de fator de crescimento derivado de plaquetas, sinapsinas, a acetilcolinesterase e o receptor NMDAR-1.

1.3.3 Complexo pós-sináptico (PSD-95)

Durante o período de sinaptogênese as PSD's mudam sua estrutura e composição. As expressões de algumas proteínas deste complexo aumentam (por exemplo, a PSD-95), e atingem seus picos durante a 2-4ª semana do período pós-natal, sendo relacionado à formação e maturação das sinapses no SNC (CHEN *et al*.,2005).

O GluN2B é expresso em neurônios imaturos e determina as propriedades do canal glutamatérgico, tal como a regulação de seu acoplamento com moléculas de sinalização intracelular (moléculas como neuromediadores). Já a SAP102 (um membro da família PSD-95) desempenha um papel importante na localização do receptor. Em conjunto, o GluN2B e a SAP102 são responsáveis pela localização e maturação das sinapses glutamatérgicas (CHEN *et al*., 2005).

Em um determinado estágio do desenvolvimento o complexo GluN2B-SAP102 é substituído pelo complexo GluN2A (NR2A, subunidade dos receptores NMDA), que faz parte do complexo PSD-95 nas sinapses, gerando mudanças na função do receptor e na plasticidade sináptica (SHENG *et al.*, 2011).

A abertura dos olhos, em ratos, está associada ao recrutamento de PSD-95, em especial ao complexo GluN2A. Por ser um dos componentes dos receptores NMDA's, ao serem induzidos por pela potenciação de longo prazo (LTP) aumentam sua distribuição, se compararmos com a distribuição de

receptores que contém GluN2B em animais neonatos. Assim, a composição do receptor NMDA, bem como a sua associação com determinados complexos pode ter sua atividade regulada na região das PSD's, principalmente no SNC em desenvolvimento (SHENG *et al.*, 2011).

As PSDs são um complexo de proteínas em forma de disco que revestem a membrana pós-sináptica, cuja massa total foi estimada em torno de 1 milhão kDa, destacando a proteína PSD-95, que está associada aos receptores pós-sinápticos glutamatérgicos (como NMDA e AMPA) e elementos do citoesqueleto. Dentre outras proteínas encontradas no complexo de PSD's podemos citar moléculas de adesão celular (por exemplo, a N-caderina, dependente de cálcio), proteínas kinases, entre outras (DOSEMECI, 2007; CHEN *et* al. 2005).

El-Husseini *et al.* (2000), observaram que a superexpressão de PSD-95 em neurônios do hipocampo pode modular a maturação das sinapses glutamatérgicas. Esta superexpressão também reforça as atividades pós-sinápticas e as atividades dos receptores glutamatérgicos, além de melhorar a maturação do terminal pré-sináptico. Estes resultados demonstram que a PSD-95 desempenha um papel importante no desenvolvimento sináptico e também sugerem que esta pode estar envolvida na estabilização das sinapses e na plasticidade.

1.3.4 Proteína associada ao microtúbulo2 (MAP-2)

A proteína associada ao microtúbulo2 (MAP-2) foi considerada antigamente uma proteína estritamente estrutural, estática e que juntamente com outras proteínas do citoesqueleto mantinham a neuroarquitetura. Mas ao contrário do que se suspeitava, a MAP-2 tem um papel importante no crescimento, na diferenciação e na plasticidade dos neurônios, além de atuar juntamente com fatores de crescimento, neurotransmissores e regular a formação de espinhos dendríticos (JOHNSON; JOPE, 1992).

O comprometimento de certos efetores de microtúbulos causa transtornos graves durante o neurodesenvolvimento. Dentre estes transtornos podemos citar a lisencefalia, síndrome do córtex duplo e a microcefalia. Para a regulação estrutural, encontramos uma família de MAPs estruturais, incluindo a MAP2,

que foi descrita como proteína estabilizadora de microtúbulos. A inibição aguda de qualquer MAP estrutural em neurônios pode acarretar em uma diminuição do crescimento neurítico, proporcionando a ideia de que a estabilização do microtúbulo seria crucial para a diferenciação neuronal durante o desenvolvimento encefálico (DELOULME *et al*, 2015).

1.3.5 Neurofilamentos

O citoesqueleto neuronal é composto de várias proteínas estruturais dentre elas, os neurofilamentos, que são importantes durante a axogênese. Durante o desenvolvimento, o crescimento axonal sofre influências da combinação entre os filamentos de actina e os microtubulos, porém o papel que os neurofilamentos desempenham durante este processo não está totalmente esclarecido. O controle de crescimento axonal do neurônio e o controle da velocidade de transmissão de neuromediadores são duas funções reconhecidas para os neurofilamentos (JULIEN, 1999).

Neurofilamentos são os principais tipos de filamentos intermediários encontrados em neurônios adultos e compreendem três subunidades (61kDa, 90 kDa e 120 kDa). Durante a neurogênese, as subunidades de neurofilamento pequena de 61 kDa e média de 90 kDa são co-expressas, enquanto que a subunidade pesada de 120 kDa só será ativada no período pós-natal. Estes três subtipos de neurofilamentos partilham juntamente com outros tipos de filamentos um domínio de aproximadamente 310 aminoácidos (AZOGUI *et al*, 2015).

1.4 Efeitos da nicotina no desenvolvimento do sistema nervoso central

Vários eventos que caracterizam o desenvolvimento do SNC são considerados fundamentais durante os períodos pré e pós-natal. Dentre eles está a sinaptogênese, principal evento relacionado com a maturação das sinapses e dos neurônios. Estudos demonstram que a exposição à PTA durante este período pode desencadear uma série de alterações na morfologia, modulação, e sobrevivência de neurônios, além de influenciar a expressão gênica de alguns fatores importantes nesta fase. Estes efeitos representam o

potencial teratogênico conferido à nicotina, principal componente do cigarro (MANSVELDER *et al*., 2002).

A nicotina exerce seus efeitos quando se liga aos receptores colinérgicos nicotínicos, os quais estão localizados em todo o SNC. Durante o desenvolvimento dos humanos, os receptores nicotínicos são expressos no primeiro trimestre e exibem um complexo padrão de expressão, sendo encontrados em várias regiões. Podem modular vários outros receptores e neurônios como, por exemplo, participar da maturação dos neurônios catecolaminérgicos localizados em regiões envolvidas na regulação do movimento, do humor e da atenção. A ativação destes receptores afeta a liberação de vários neuromediadores como a dopamina, noradrenalina, adrenalina, acetilcolina, serotonina, GABA, glutamato e outros neuromoduladores como a substância P (MANSVELDER. *et al*, 2002; LEOPERCIO *et al*, 2004).

A exposição à nicotina durante a gestação está associada a problemas cognitivos, motores e sensoriais. Estes problemas podem se estender da infância até a fase adulta (WICKSTRÖM, 2007; DWYER, 2009). Quando o feto é exposto à nicotina há uma estimulação muito acima dos níveis considerados fisiológicos para esta fase do desenvolvimento, podendo levar à ativação de vários fatores ontogenéticos que atuam neste período, como o protoncogene c-*fos.* O c-*fos* é um gene utilizado como marcador neural de ativação celular, sendo expresso quando os neurônios estão despolarizados, importante para a diferenciação, proliferação, e sobrevivência das células neuronais. A superexpressão deste gene resultará na indução de apoptose, devido ao aumento exacerbado do metabolismo neuronal (SLOTKIN *et al*., 2004).

Estudos realizados com ratos durante o período da gestação demonstram que a exposição à nicotina pode diminuir a expressão gênica de vários fatores importantes para a maturação do SNC. Slotkin *et al* (1987) constataram que o SNC,de alguma maneira, tenta reparar os danos causados pela nicotina, porém observaram que esta tentativa de reparo pode ocorrer entre o final da neurogênese e no começo da gliogênese, sugerindo que esta perda neuronal será substituida por células gliais.

A substituição por células gliais é considerada um padrão típico quando há perda neural, que pode ser causada por exposição a compostos

neurotóxicos. Considerando esta substituição, os danos causados pela nicotina durante o desenvolvimento fetal podem ser irreversíveis. No período pós-natal, a nicotina também afeta a regulação da atividade da ornitina descarboxilase, uma enzima responsável pela coordenação da biossíntese durante a replicação e diferenciação celular, indicando que a maturação neuronal ocorrerá de modo anormal (SLOTKIN *et al*.,1987; DWYER *et al*.,2008).

Várias pesquisas têm documentado a influência da nicotina sobre o desenvolvimento do SNC, no entanto este desenvolvimento se estende até o período da adolescência e vários eventos como sinaptogênese, mielinização, maturação da área cortical e a expressão de diferentes subtipos de receptores sinápticos também estão presentes neste período (SMITH *et al*.,2015). Um estudo realizado com camundongos expostos à nicotina durante a amamentação (P1 –P25) demonstrou que estes animais tiveram prejuízos durante a formação da memória de longo prazo no período da adolescência, pois apresentaram dificuldades em localizar o objeto ao serem testados em testes comportamentais de localização de objetos (NAKAUCHI *et al*, 2015).

Considerando que a nicotina é uma droga que pode causar danos neuronais significativos e que a adolescência é considerada também como um período vulnerável, Villaça *et al.* (2004), avaliaram se a diferença entre as concentrações de nicotina nos cigarros interfere no funcionamento do sistema colinérgico, no período da adolescência. Os autores submeteram camundongos à fumaça de cigarros entre o 30° e o 45° dia de vida e utilizaram cigarros produzidos pela Universidade de Kentucky que possuíam concentrações diferentes de nicotina.

Os pesquisadores constataram que mesmo nas exposições aos cigarros de baixa concentração de nicotina, elementos da transmissão colinérgica, como a reciclagem da acetilcolina e o retorno da colina para a membrana pré-sináptica, foram alteradas. Animais expostos ao cigarro 3R4F (0,73 mg de nicotina/cigarro) apresentaram aumento no retorno da colina no hipocampo e no córtex, sendo que nos animais expostos ao cigarro 4A1 (0,168 mg de nicotina/cigarro) o retorno de colina aumentou somente no córtex (VILLAÇA *et al*.,2004).

Wang *et al*. (2008) realizaram um estudo em que os animais eram expostos à nicotina durante 14 dias do período gestacional. Os autores

constataram que no período pós-natal estes animais apresentaram deficiências no sistema glutamatérgico no hipocampo, sendo que ocorreu um aumento dos receptores AMPA e NMDA durante o período de desenvolvimento, porém ao investigar os animais na idade adulta, em P63, constataram que a expressão destes mesmos receptores havia sido reduzida.

No hipocampo, os receptores glutamatérgicos podem modular o aprendizado, a memória e a cognição, o que evidencia que os efeitos da exposição à nicotina durante o período de desenvolvimento podem perdurar até a idade adulta. Estes receptores glutamatérgicos estão envolvidos nos mecanismos de plasticidade e na formação de novos espinhos dendríticos durante a LTP (SMITH *et al*., 2015). Brown e Kolb (2001) também mostraram que a nicotina pode causar alterações na morfologia dendrítica em camundongos adultos.

Levando em consideração a exposição à xenobióticos como a nicotina, salientamos a PTA, que é considerada um problema de saúde pública. Vários estudos epidemiológicos evidenciam as implicações das exposições tabagísticas ambientais em fases precoces da vida (intrauterina e infância) e as suas consequências para a saúde na vida adulta (WÜNSCH FILHO *et al.*, 2010).

Trabalhos anteriores de nosso grupo mostram que a exposição de camundongos à PTA em uma fase crítica do desenvolvimento induz estresse oxidativo em diferentes regiões encefálicas (TORRES *et al*., 2012), além de danos ao processo de mielinização no nervo óptico e alterações em proteínas específicas expressas em diferentes estágios de maturação dos oligodendrócitos: Olig-1 e proteína básica de mielina (TORRES *et al*., 2014). Ainda, observamos que a exposição de camundongos à PTA durante o início do período pós-natal leva à diminuição de proteínas sinápticas no hipocampo e a danos ao processo de aprendizagem e memória (TORRES *et al*., 2015).

Assim, o presente projeto visou aprofundar o estudo dos efeitos da exposição da PTA no início do período pós-natal em parâmetros envolvidos na transmissão sináptica. Para tanto, foram utilizados cigarros com diferentes concentrações de nicotina e quantificadas proteínas pré e pós-sinápticas como a sinaptofisina, sinaptobrevina, sinaptotagmina, PSD-95 e EGR-1, além de marcadores sinápticos como os neurofilamentos e MAP-2, no cerebelo,

hipocampo e tronco encefálico de camundongos C57BL/6, na infância, na adolescência e na fase adulta.

2 Objetivo

2 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição no início do período pós-natal à fumaça de cigarros com diferentes concentrações de nicotina (3R4F e 4A1) com foco nas proteínas envolvidas com a transmissão sináptica, em regiões ligadas a cognição e memória (hipocampo), as funções vitais (tronco encefálico) e na interpretação dos movimentos (cerebelo), durante a infância, adolescência e na fase adulta.

2.1 Estratégias experimentais

Avaliar nos animais C57BL/6 de 15, 35 e 65 dias de vida, que foram expostos aos cigarros 3R4F ou 4A1 nos primeiros dias de vida, os seguintes parâmetros:

- Quantificação das proteínas sinápticas: sinapsina, sinaptofisina, sinaptobrevina, sinaptotagmina, EGR-1 e PSD-95 por *Western-Blotting.*
- Expressão gênica de *Egr-1* por PCR *Real time.*
- Concentração proteica de neurofilamentos (NF- 68, 160 e 200 kDa) e de MAP-2 por Imunofluorescência.

3 Material e Métodos

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 e suas respectivas proles, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Todos os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada por ar condicionado (22 ± 2 ºC) e ciclo de 12 horas claro/escuro (claro às 7h e escuro às 19h), com água e ração fornecidas livremente, de acordo com a aprovação do Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEUA/FCF 96.2014-P479) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo (Anexo 1).

3.2 Exposição dos animais à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1

A exposição à fumaça do cigarro foi realizada conforme Torres *et al*. (2012, 2014, 2015) e ocorreu em dois horários, 9h e 16h, com duração de uma hora, sendo que os animais foram expostos do 3º ao 14º dia de vida, acompanhados pelas respectivas mães. A exposição foi realizada dentro de uma câmara de polipropileno (564x385x371mm) acoplada a um sistema Venturi onde um fluxo de ar, dentro de uma tubulação suavemente cônica, produz uma pressão negativa (vácuo), sendo proporcional à velocidade do fluxo e às dimensões da tubulação, mimetizando assim a tragada do cigarro (Figura 9). Para a fumaça central, ou seja, a que é liberada pelo sistema Venturi, foram utilizados 4 cigarros acoplados ao sistema, que queimavam a cada 15 minutos. Para a fumaça lateral foram utilizados 3 cigarros a cada 20 minutos, sendo que os animais ficavam com um intervalo de 10 minutos sem cigarro. Foram utilizados cigarros referência desenvolvidos pela Universidade do Kentucky (*Tobacco Health Research – Research cigarettes)* com diferentes concentrações de nicotina: o cigarro 4A1 (0,16 mg de nicotina/cigarro) e o 3R4F (0,73 mg de nicotina/cigarro). As exposições foram realizadas sempre nos horários determinados para respeitar o ciclo circadiano dos animais.

Os animais do grupo controle foram colocados em um sistema parecido com o dos animais fumantes, porém foram expostos somente ao ar sintético (21% de O_2 + 79% de N_2, cilindro de gás da *Air products*®).

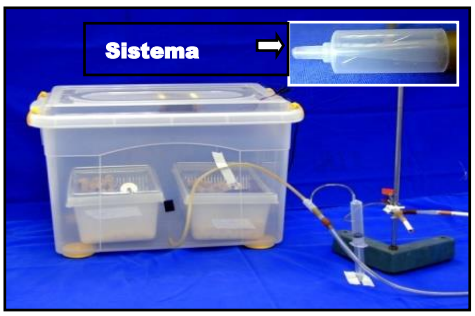


Figura 9: Câmara de exposição à fumaça do cigarro

3.3 Desenho experimental

Os animais foram expostos, juntamente com suas mães, à fumaça de cigarro a partir do 3º dia de vida (P3) até o 14º dia (P14). Para cada cigarro (3R4F e 4A1) as análises foram realizadas em seis grupos experimentais (n=6), como descrito a seguir:

- Grupo Tratado I: animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F ou 4A1 de P3 a P14 e eutanasiados 24 horas após a última exposição (P15-infância).
- Grupo Controle I: animais expostos ao ar sintético de P3 a P14 e eutanasiados 24 horas após a última exposição (P15-infância).
- Grupo Tratado II: animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F ou 4A1 de P3 a P14 e eutanasiados no 35º dia de vida (P35-adolescência).
- Grupo Controle II: animais expostos ao ar sintético de P3 a P14 e eutanasiados no 35º dia de vida (P35-adolescência).
- Grupo Tratado III: animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F ou 4A1 de P3 a P14 e eutanasiados no 65º dia de vida (P65-adulto).
- Grupo Controle III: animais expostos ao ar sintético de P3 a P14 e eutanasiados no 65º dia de vida (P65-adulto).

Em P15, P35 ou P65 os camundongos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e o encéfalo rapidamente retirado e mergulhado em solução salina 0,9% de cloreto de sódio fria. As estruturas encefálicas (hipocampo, cerebelo e tronco encefálico) foram dissecadas sobre uma placa de petri gelada coberta com papel de filtro também embebecido em solução salina gelada, e congeladas em gelo seco. As estruturas foram armazenadas em freezer a -80ºC até os ensaios de *Western-blotting* e PCR *Real time*. Para os ensaios de Imunofluorescência, os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina 0,9%, seguida de uma solução fixadora de paraformaldeído 4% dissolvido em tampão fosfato 0,2 M (PB tampão fosfato de sódio, pH 7,4). Após a perfusão, os encéfalos foram coletados e armazenados em paraformaldeído 1% durante 24 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% em PB 0,1 M. Em seguida, os tecidos foram congelados em gelo seco e armazenados em freezer -80ºC até serem preparados.

3.4 Determinação de Carboxihemoglobina (COHb)

Para a determinação da porcentagem de COHb, 0,1 mL de sangue total foi hemolisado em 10 mL de solução hemolisante (1 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 6,8 + 9 mL de água destilada) e após agitação por inversão, a solução foi deixada em repouso por 10 minutos. Em seguida, 0,2 mL do hemolisado foi diluido em 2,3 mL de solução redutora (1,25mg/mL de ditionito de sódio em tampão fosfato 0,1M pH 6,8). A solução foi tampada e deixada à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, a leitura espectrofotométrica foi realizada em 420 e 432 nm, utilizando como branco a solução redutora. As absorbâncias obtidas foram aplicadas na fórmula a seguir:

$$\%\mathrm{CO}Hb = \frac{1 - (AR\ x\ F1)}{AR\ (F2 - F1) - \ F3 + 1}\ x\ 100$$

Sendo: AR = Absorbância em 420/ Absorbância em 432

Os fatores de calibração F1, F2 e F3 foram previamente padronizados e determinados em nosso laboratório, sendo F1: 1,2814; F2: 0,7672 e F3: 1,9170 (TORRES, 2009).

3.5 Determinação da concentração de nicotina e cotinina por UPLC-MS/MS

A determinação da nicotina e da cotinina em plasma foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta performance (ACQUITY) acoplado à espectrômetro de massas no modo tandem (QUATPREMXE) - UPLC-MS/MS da Waters Corporation (MILFORD, MA, USA). Foram utilizados 150 µL de plasma diluído em 150 µL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0. O padrão interno utilizado foi o prolintano, previamente diluído em metanol, numa concentração final de 1 µg/mL.

As amostras foram submetidas à extração em fase sólida com cartucho SPE BOND ELUT CERTIFY 130 mg (Agilent *Technologies, Palo Alto, CA, EUA*), segundo SKOOG (2006). Os cartuchos foram previamente condicionados com 2,0 mL de metanol e 2,0 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0. Em seguida, o cartucho foi lavado duas vezes com 3,0 mL água milli-Q e 3,0 mL HCl 0,1 M. Após sete minutos de secagem à vácuo foram adicionados 9,0 mL de metanol. A eluição foi realizada com solução de diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônio (12:3:0,3) recém preparado. Após secagem com N_2 o analito foi ressuspendido com 50 µL de metanol para injeção de 2,0 µL no UPLC.

Parâmetros Cromatográficos: Coluna Acquity UPLC® BEH 1,7 µm, 2,1 x 100 mm (Waters Corporation). Fase móvel A: formiato de amônio 1mM em H_2O com 0,1% de ácido fórmico; fase móvel B: formiato de amônio 1 mM em H_2O: ACN 5:95 v/v com 0,1% de ácido fórmico. Temperatura da coluna: 40 °C. Fluxo 0,4 mL/min. Gradiente: 98% de A entre 0 - 0,75 min., de 98% a 0% de A entre 0,75 e 1,50 min., de 0% até 98% de A entre 1,50 e 1,51min, 98% de A entre 1,51 e 2,5 min.

As transições utilizadas foram: 218,28>64,83/ 71,80/ 90,80* para o prolintano, 163,09>105,99/ 116,80*/ 129,66 para nicotina e 177,04>79,81*/

97,84/ 145,88 para cotinina. Os asteriscos indicam a transição utilizada para quantificação dos analitos.

3.6 *Western blotting*

As estruturas encefálicas foram homogeneizadas em tampão Tris 50 mM pH 7,4 com coquetel inibidor de protease na diluição 1:1000 e PMSF 0,5 M diluído em etanol absoluto. Para o hipocampo e cerebelo foi utilizada a diluição 1:5 (g/mL) e para o tronco encefálico a de 1:2 (g/mL).Após rápida homogeneização em sonicador, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 4ºC e 1000 x g (1000 rcp). Em seguida realizou-se a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford (BRADFORD, 1979).

As amostras foram diluídas em tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, posteriormente aquecidas com tampão de amostra 2x (Tris-HCl 0,25M, SDS 4%, Glicerol 20%, β-Mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,04%) por 5 min e armazenadas em freezer -80°C até o momento das análises. Foi realizada eletroforese utilizando o sistema da Bio-Rad® e para cada proteína investigada foi preparado gel de poliacrilamida com porcentagem de 15%. Após a eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas para membrana de PVDF. A Tabela 2 apresenta as proteínas que foram investigadas bem como a descrição dos os anticorpos utilizados nesse trabalho.

Tabela 2: Representação de proteínas e seus respectivos anticorpos

Proteínas	Anticorpos	Fabricante	Código	Peso Molecular	Diluição
Sinaptotagmina	Anti-sinaptogamina	Abcam	ab13259	64 kDa	1:1000
EGR-1	Anti-EGr-1	Santa Cruz	SC-189	~ 82 kDa	1:500
Sinaptofisina	Anti-sinaptofisina	Abcam	ab8049	38 kDa	1:500
Sinaptobrevina	Anti-sinaptobrevina	Abcam	ab18013	17 kDa	1:1000
Sinapsina	Anti-sinapsina	Abcam	ab64581	74 kDa	1:1000
PSD-95	Anti - PSD-95	Abcam	ab13552	100 kDa	1:1000

Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de Ponceau S por 3 min para verificar a eficiência do método. Em seguida, algumas lavagens com água destilada foram realizadas e as membranas bloqueadas com leite desnatado em tampão TBS-T por 2 horas. As membranas foram incubadas com os anticorpos citados na tabela 2, *overnight,* de acordo com as padronizações realizadas. No dia seguinte à incubação, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas por 2 horas com um anticorpo secundário marcado com peroxidase. O excesso de conjugado foi removido com mais um ciclo de lavagens (com TBS-T) e os antígenos foram revelados com o ECL de quimioluminescência. As imagens foram detectadas (Amersham Imager 600, GE Healthcare) e digitalizadas (IQuantCapture 400, v 1.0.0, GE Healthcare). As intensidades das bandas imunorreativas foram quantificadas pelo programa ImageQuant e expressas em unidades arbitrárias. A β-actina foi utilizada como fator normalizador.

3.7 PCR *Real time*

As estruturas encefálicas foram homogeneizadas com 1 mL de Trizol® (Invitrogen) e deixadas em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio para separação das fases aquosa e orgânica e, após agitação manual, as amostras foram deixadas em repouso por 10 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000x g por 15 min a 4 ºC para a separação do RNA, DNA e proteínas.

O RNA foi então coletado em novo microtubo ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol. A seguir, estas foram agitadas manualmente e deixadas em repouso *overnight* à -20ºC para a precipitação do RNA. Após nova centrifugação de 12.000 x g por 10 min a 4ºC, o sobrenadante foi descartado evitando contato com o precipitado de RNA. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de etanol 95% e a amostras foram centrifugadas a 7.500 x g por 5 min a 4ºC. Após a remoção do sobrenadante, foi adicionado 0,5 mL de etanol 75% e novamente centrifugado a 7.500 x g por 5min a 4ºC. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* foi deixado para secar em temperatura ambiente, por 10 min. O RNA foi ressuspenso em 30 µL de água ultra pura (*RNAse/DNAse free*),

fervido a 55 ºC e logo após a quantificação foi realizada em NanoDrop 1000 (Uniscience®).

Para a preparação do cDNA, foi utilizada uma concentração de 1 µg/µL de RNA diluído em 13 µL de solução aquosa *RNAse/DNAse free*. Em seguida adicionou-se1 µL de Vilomix®, que foram misturados com o auxílio de uma pipeta. Esta mistura foi levada ao termociclador por 30 min a 50 ºC no primeiro ciclo, 20 minutos a 70 ºC no segundo e 10 minutos a 4ºC no terceiro. O cDNA foi armazenado em -20 ºC até realização das análises.

Para a realização do PCR *real time* o cDNA preparado foi diluído em uma proporção de 1:5, sendo utilizados 3µL da solução para cada análise. Foi preparado um meio reacional contendo 9µL de Syrbr*green* Master Mix® (genes analisados foram Egr-1e *18S*,sendo este o gene endógeno utilizado como normalizador). Este meio foi adicionado à placa de PCR. A reação foi levada ao termociclador *AppliedBiosystems* 7500HT *Real-Time* PCR *System*®, e a quantificação foi realizada utilizando os dados de expressão relativa do gene estudado em relação ao gene endógeno ($\Delta\Delta$Ct) (PFAFF, 2001).

3.8 Imunofluorescência

Os encéfalos congelados foram cortados em uma espessura de 40 µm em criostato (CM3050, Leica) e conservados em microtubo de 5 mL contendo solução anti-freeze (Tampão fosfato de sódio 0,4 M+ sacarose + etilenoglicol) à -20°C.

Os cortes foram colocados em peneiras de 0,4 µm e lavados em placas de 6 poços contendo PBS, 3x de 10 min para retirar o excesso de solução anti-freeze. Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados durante duas horas com solução de bloqueio 5 % (BSA 5% +Triton 0,01%). Com o bloqueio realizado, os cortes foram incubados *overnight* a -4ºC em um microtubo de 2 mL contendo os anticorpos primários, *mouse monoclona*l anti-neurofilamentos 1/50 (68 kDa, 160 kDa e 200 kDa; Invitrogen®) e *mouse monoclonal* anti-MAP2-1/2500 (Abcam), diluídos em solução de bloqueio 5%. No dia seguinte, os cortes foram lavados em PBS, 3x de 5 min, e em seguida colocou-se uma solução de Metanol 10% e H_2O_2 1% (diluído em PBS) por 20 minutos para diminuir o *background* dos cortes. A seguir, as amostras foram lavadas 1x com

PBS e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado a fluoróforo (anti-rabbit AlexaFluor 488 e 594, 1:500, Abcam), diluído em solução de bloqueio. Finalmente, após nova lavagem de 3x de 5 min com PBS, os cortes foram incubados por 20 min a temperatura ambiente com DAPI 300 nM (Sigma-Aldrich) diluído 1/1000 em PBS. Lavagens foram realizadas com PBS, 4x de 10 min, para a retirada do excesso de DAPI, os cortes foram montados nas lâminas *Superfrost* e após a secagem adicionou-se Fluoromount-G (Sigma Aldrich®) e selou-se com esmalte incolor. As análises e aquisições de imagem foram realizadas, escolhendo-se três locais aleatórios das regiões escolhidas e a captura das imagens foi em microscópio de fluorescência, com a lente de 10X (Zeiss®).

3.9 Análise Estatística

Nos ensaios de *Western Blotting,* PCR *Real time* e imunofluorescência os grupos controle e fumante foram comparados pelo teste “t” de Student utilizando o software Prism6 para *Windows* (*GraphPad Prism*).Para as análises das fotos de imunofluorescência utilizou-se o programa ImageJ. Os dados foram apresentados como média ± EPM (erro padrão da média) e considerados significativamente diferentes para valores de $p<0,05$.

4 Resultados

4.1 Determinação de COHb e determinação de nicotina/cotinina do 3R4F e 4A1

A determinação de COHb é um parâmetro de monitorização biológica para confirmar que a exposição ao cigarro se deu de forma eficaz, além disso, garantimos que o padrão de exposição não promoveu hipóxia nos animais.

A Tabela 3 representa os resultados obtidos de COHb em sangue total dos animais expostos.

Tabela 3: Valores de porcentagem de carboxihemoglobina dos animais controles e expostos à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 13 dias consecutivos. Valores expressos em média ± erro padrão. (n=8 para o grupo controle e n=8 para o grupo exposto)

	Porcentagem de COHb
Controle	1,49 ± 1,294
Exposição ao 3R4F	22,74 ± 0,956
Exposição ao 4A1	23,47 ± 1,89

Já a determinação de nicotina/cotinina também é considerada como uma monitorização ambiental, sendo a cotinina considerada um marcador que diferencia o fumante passivo do fumante ativo.

Tabela 4: Valores de nicotina/cotinina dos animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 13 dias consecutivos. Valores expressos em ng/mL. (n=5 para o grupo exposto)

	Nicotina (ng/mL)	Cotinina (ng/mL)
Exposição ao 3R4F	116,36	54,88
Exposição ao 4A1	9,94	4,94

4.2 Cerebelo

4.2.1 Análise *Western Blotting* e PCR *Real time*

As Figuras de 10 a 15 apresentam os resultados obtidos nas quantificações das proteínas sinápticas sinapsina, sinaptotagmina, sinaptofisina, sinaptobrevina, PSD-95 e do fator de transcrição EGR-1, por *Western Blotting.* A expressão do gene *Egr-1* por PCR *Real time* está apresentada na Figura 16.

Os resultados indicam que a exposição à fumaça do cigarro 3R4F no início do período pós-natal diminuiu a concentração de sinapsina na infância ($p<0,05$) e na adolescência ($p<0,01$) e aumentou a sinaptofisina na infância e na adolescência (ambos $p<0,05$) sem alterações na fase adulta. Mais ainda, foi observada diminuição de EGR-1 na infância e na adolescência (ambos $p<0,01$) e aumento na fase adulta ($p<0,05$), entretanto, sua expressão gênica diminuiu na adolescência e aumentou na fase adulta.

Nos animais expostos à fumaça do cigarro 4A1 no início do período pós-natal foi observada somente diminuição de sinaptobrevina ($p<0,05$) na fase adulta. Outra alteração causada por este cigarro foi a diminuição da expressão gênica do *Egr-1* na infância e na adolescência.

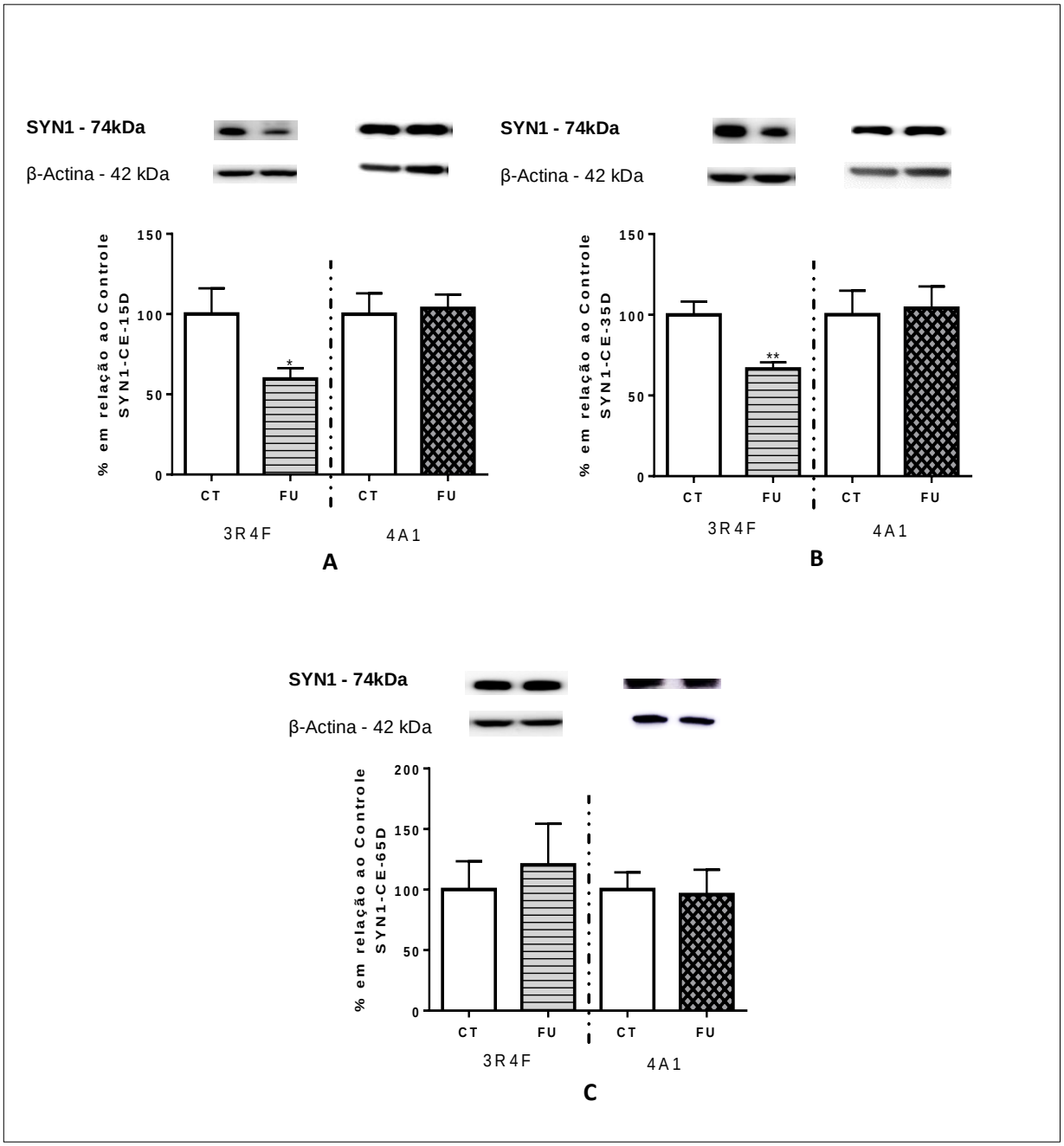


Figura 10: Análise quantitativa de sinapsina por *Western Blotting* no cerebelo de animais expostos a fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias. A -15 dias, B- 35 dias e C- 65 dias. Teste "t" de Student, *p<0,05 e **p<0,01. Dados expressos em % em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU= fumante.

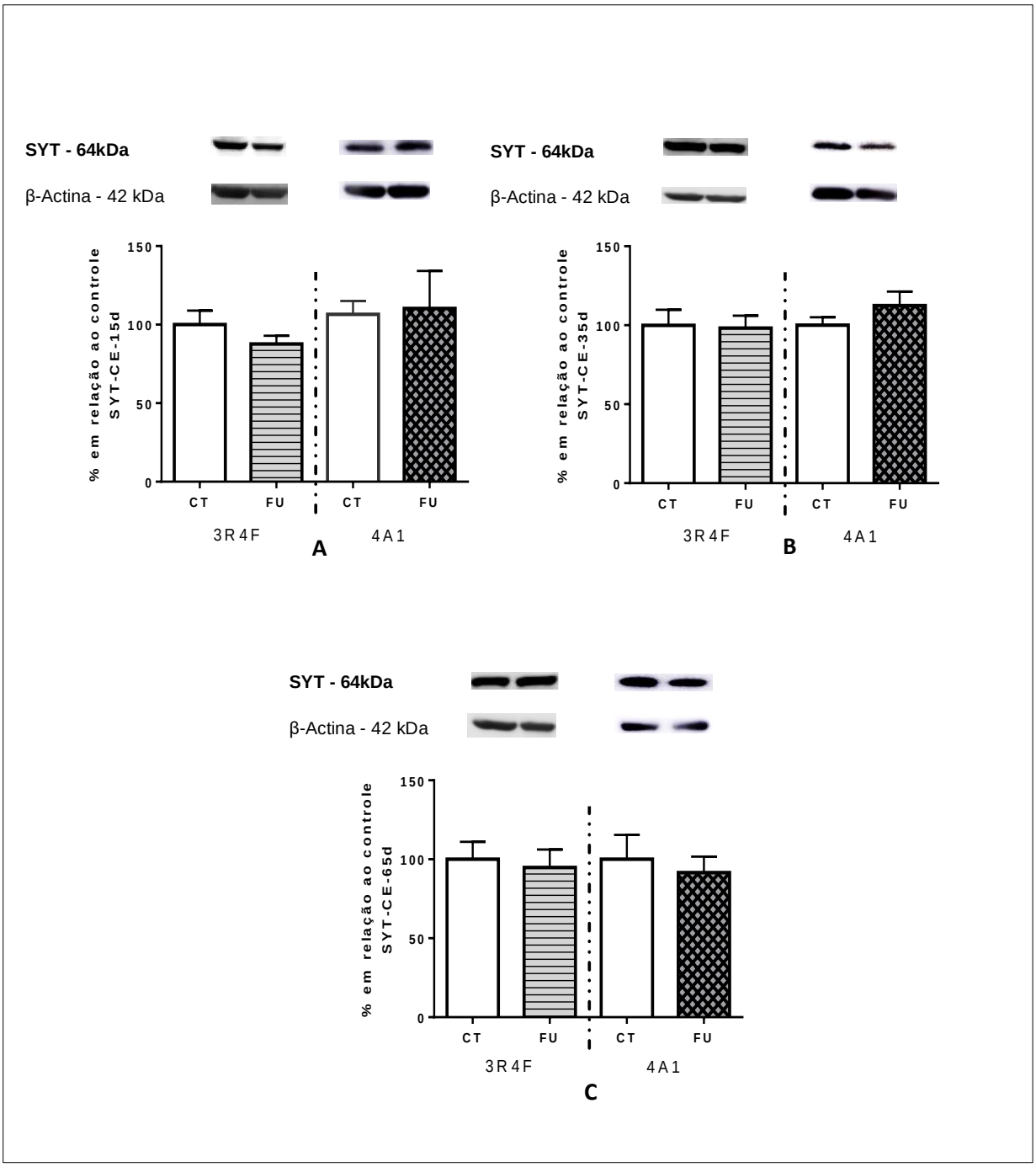


Figura 11: Análise quantitativa de sinaptotagmina por *Western Blotting* no cerebelo de animais expostos a fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias. A -15 dias, B- 35 dias e C- 65 dias. Teste "t" de Student, *p*>0,05. Dados expressos em % em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU= fumante.

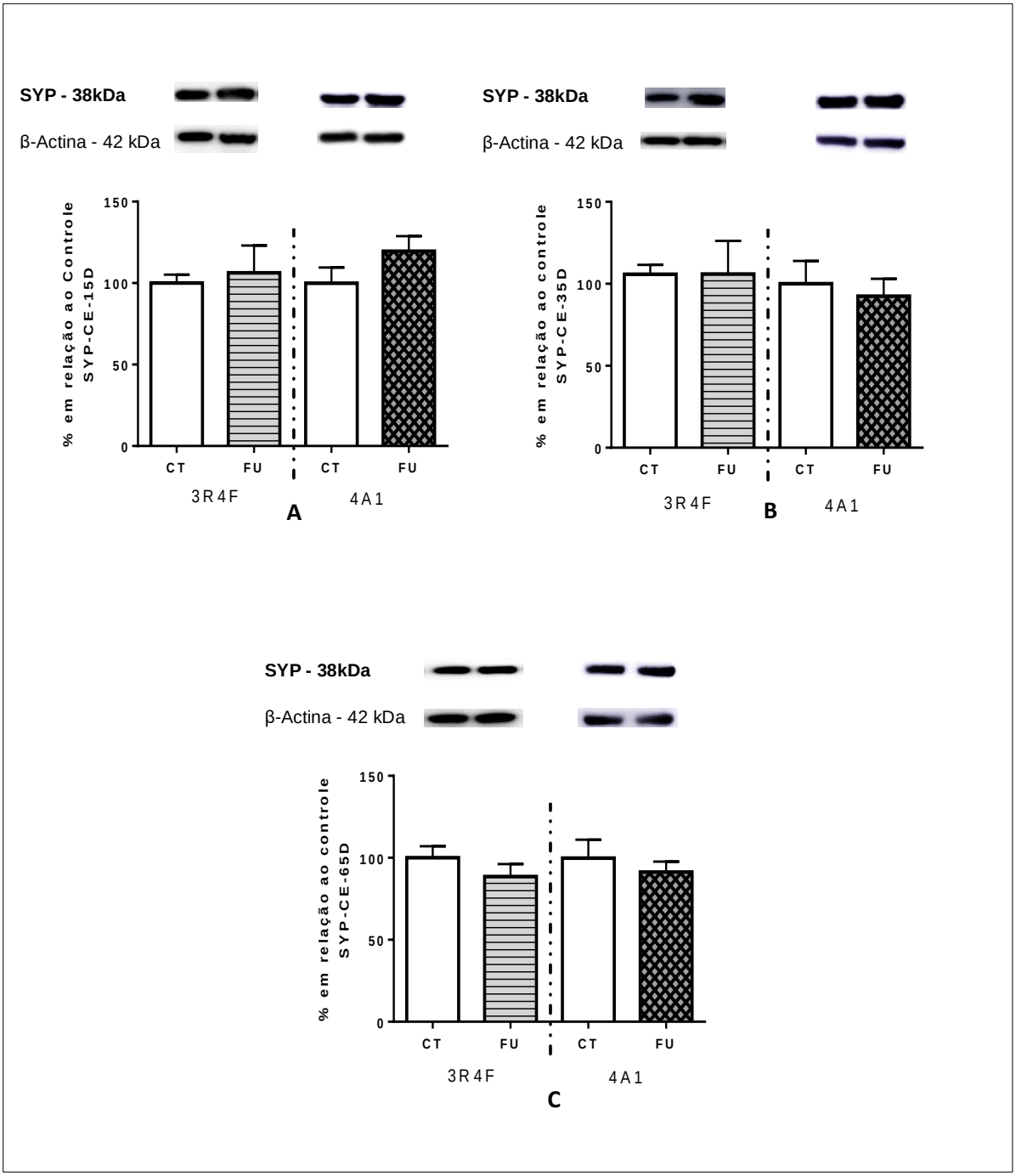


Figura 12: Análise quantitativa de sinaptofisina por *Western Blotting* no cerebelo de animais expostos a fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias. A -15 dias, B- 35 dias e C- 65 dias. Teste "t" de Student, *p*>0,05. Dados expressos em % em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU= fumante.

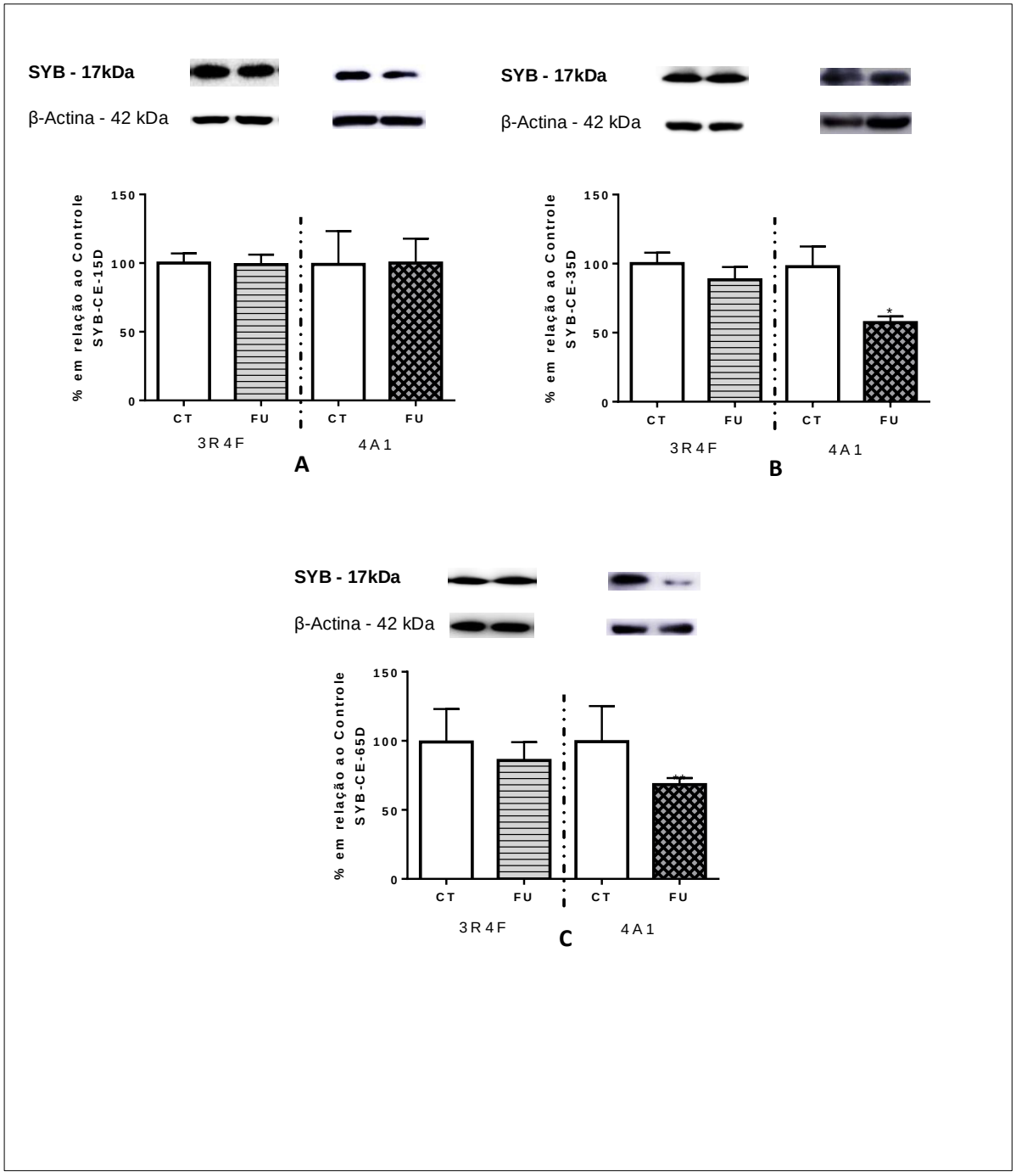


Figura 13: Análise quantitativa de sinaptobrevina por *Western Blotting* no cerebelo de animais expostos a fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias. A -15 dias, B- 35 dias e C- 65 dias. Teste "t" de Student, *p<0,05 e **p<0,01. Dados expressos em % em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU= fumante.

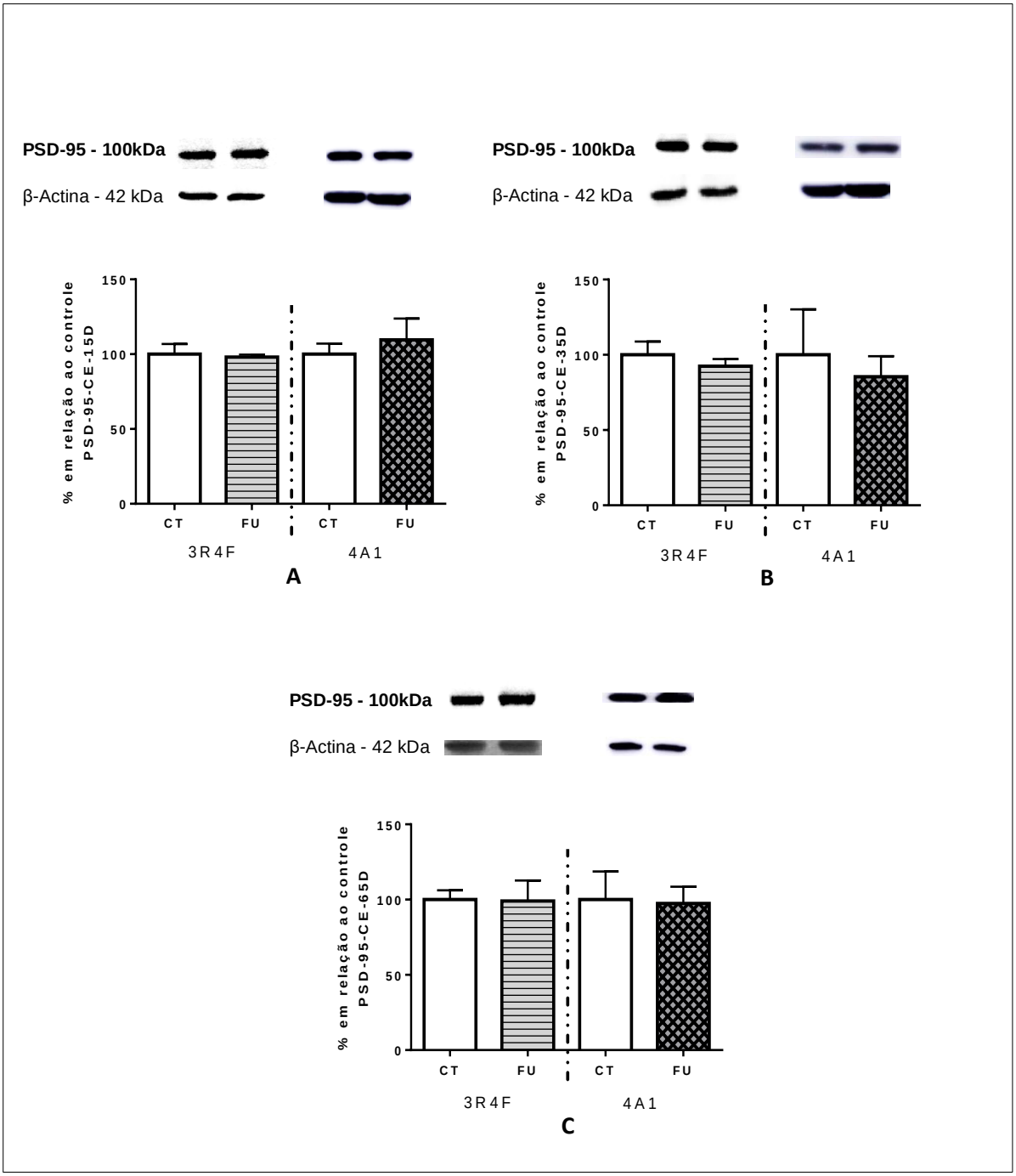


Figura 14: Análise quantitativa de PSD-95 por *Western Blotting* no cerebelo de animais expostos a fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias. A -15 dias, B- 35 dias e C- 65 dias. Teste "t" de Student, *p*>0,05. Dados expressos em % em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU= fumante.

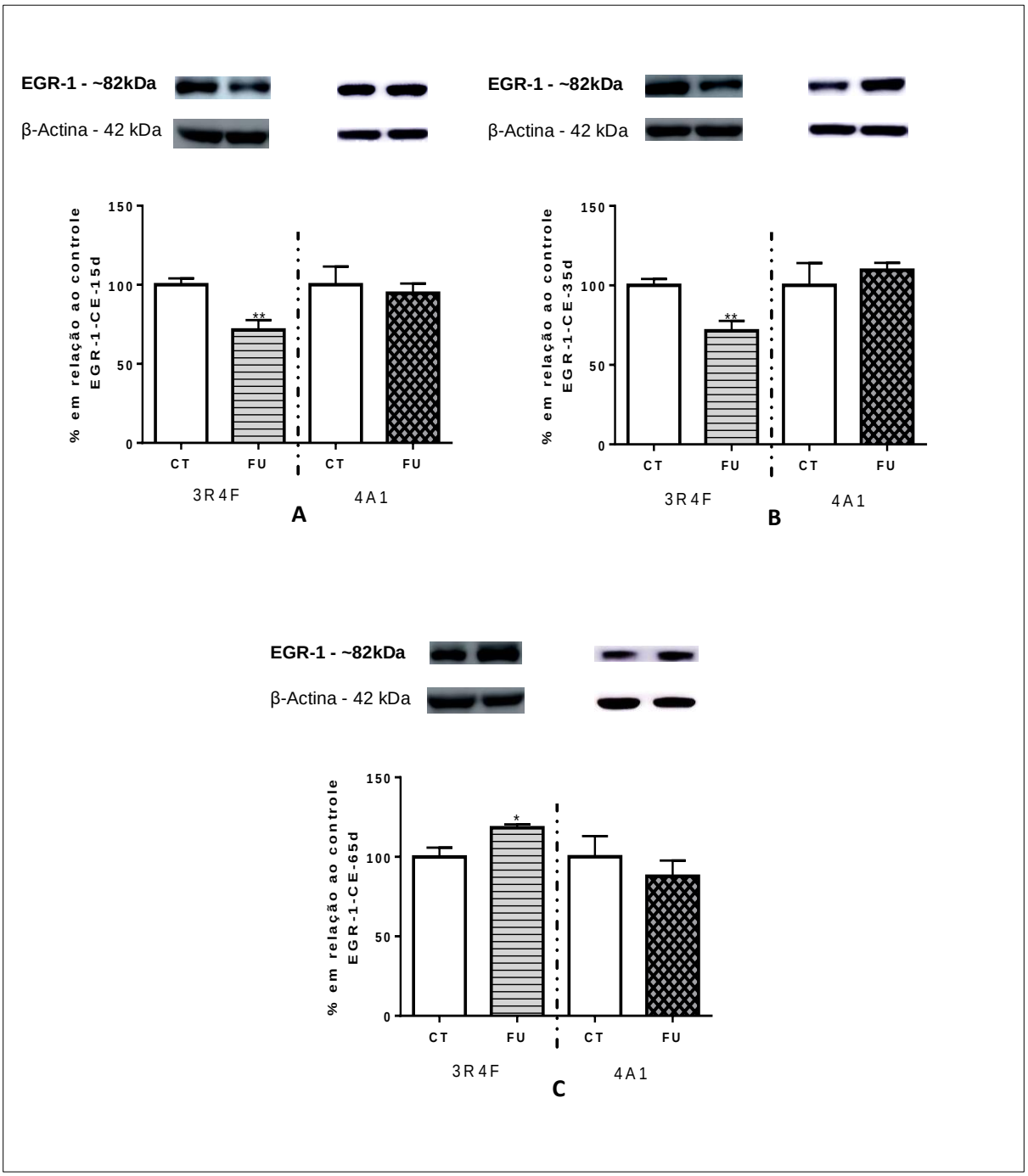


Figura 15: Análise quantitativa de ERG-1 por *Western Blotting* no cerebelo de animais expostos a fumaça do cigarro 3R4F e 4A1 por 15 dias. A -15 dias, B- 35 dias e C- 65 dias. Teste "t" de Student, *p<0,05 e **p<0,01. Dados expressos em % em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU= fumante.

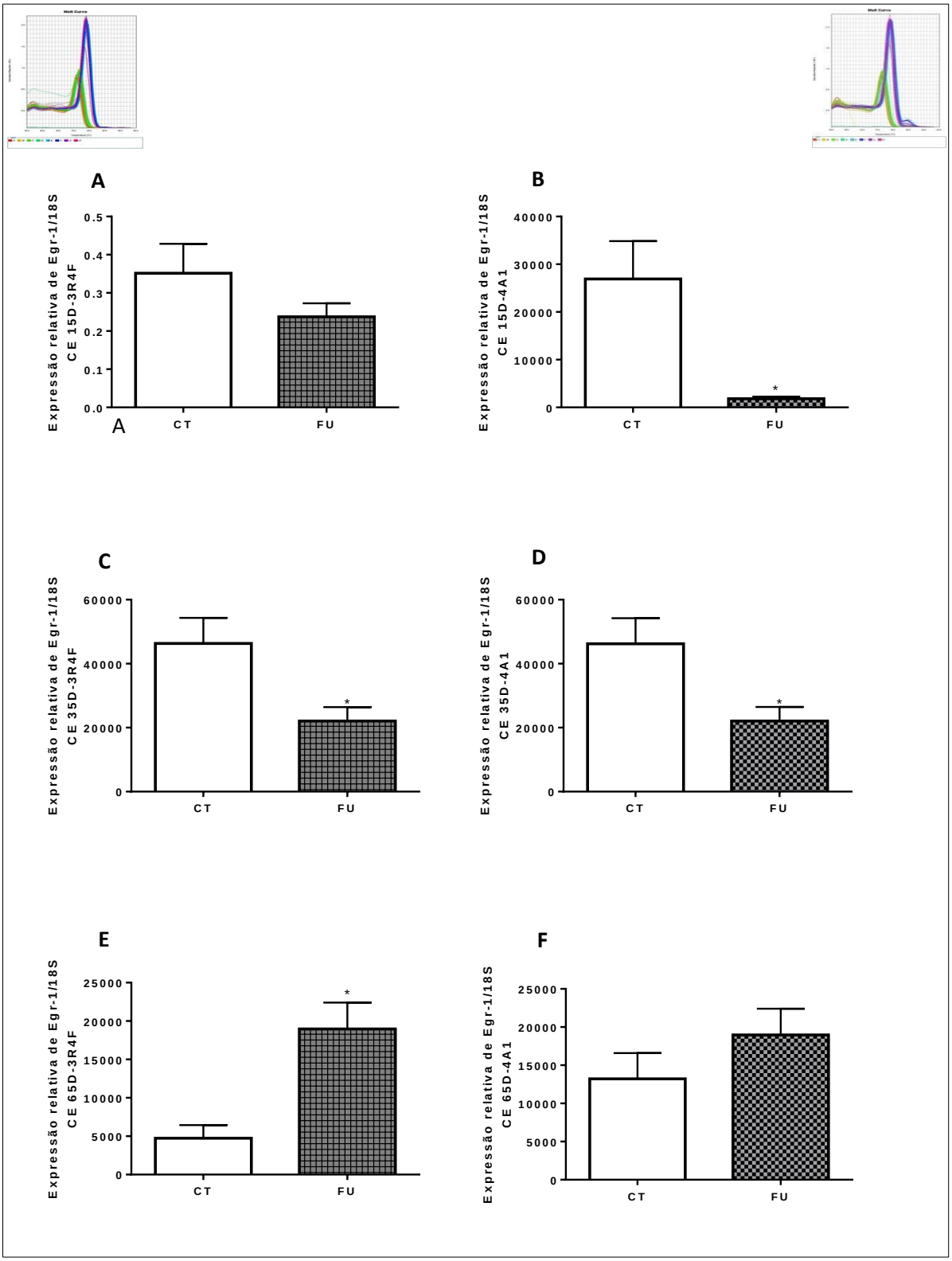
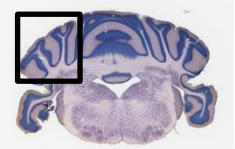


Figura 16: Análise quantitativa do gene *Egr-1* por PCR *Real time* no cerebelo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A e B- 15 dias; C e D 35 dias; E e F 65 dias. Teste "*t*" de *Student, *p*<0,05. As imagens nos campos superiores da figura representam as curvas de Melt. Dados expressos em ΔΔCt em relação ao gene endógeno *18S* (n=4). CT= controle, FU= fumante.

4.2.2 Análise de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e Neurofilamentos.

As figuras 17 e 18 mostram as fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e Neurofilamentos.



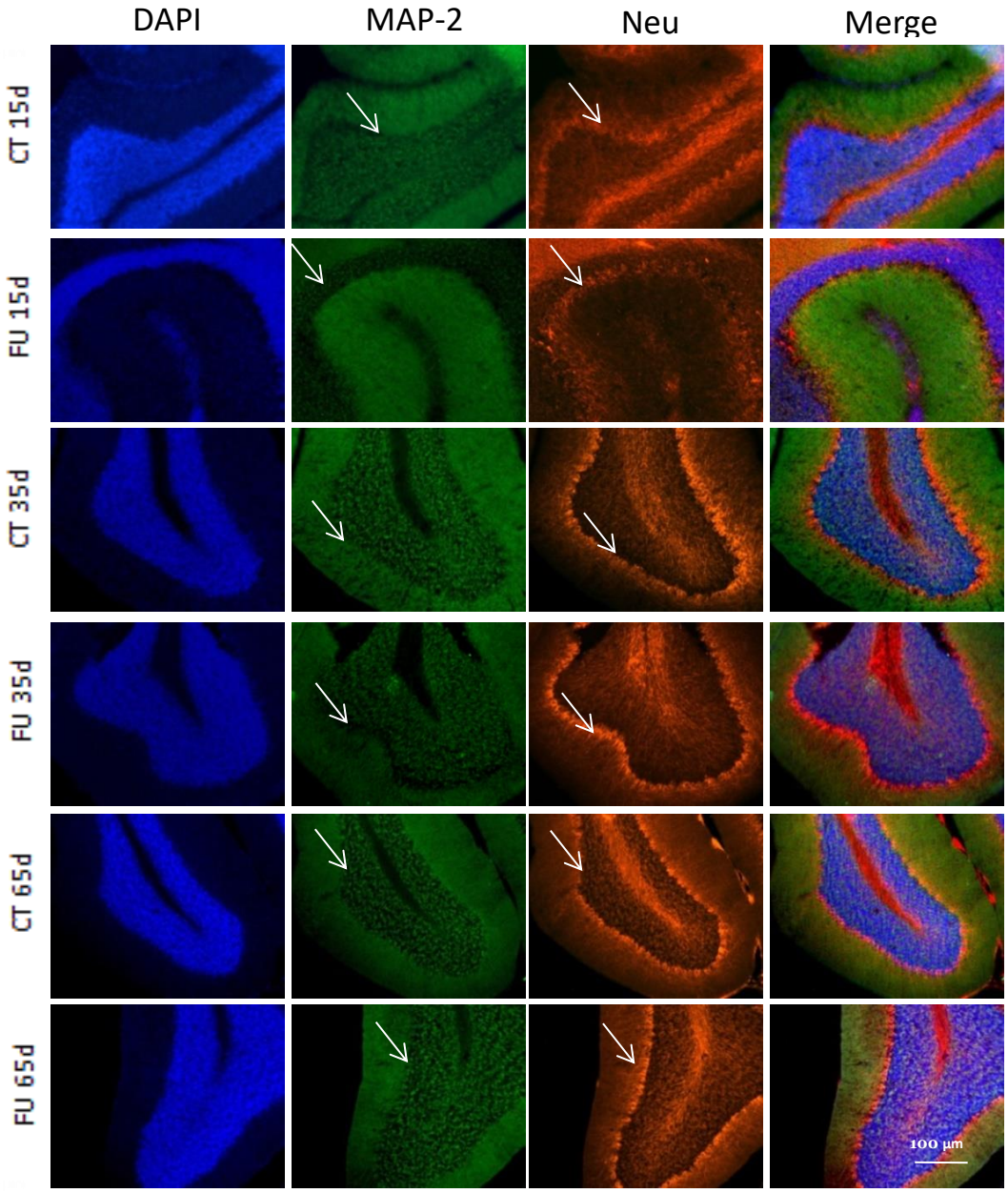
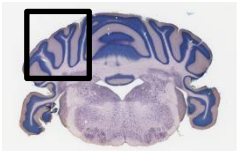


Figura 17: Fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e neurofilamentos, em animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F. As setas representam a área granular do córtex cerebelar. CT= controle, FU= fumante.



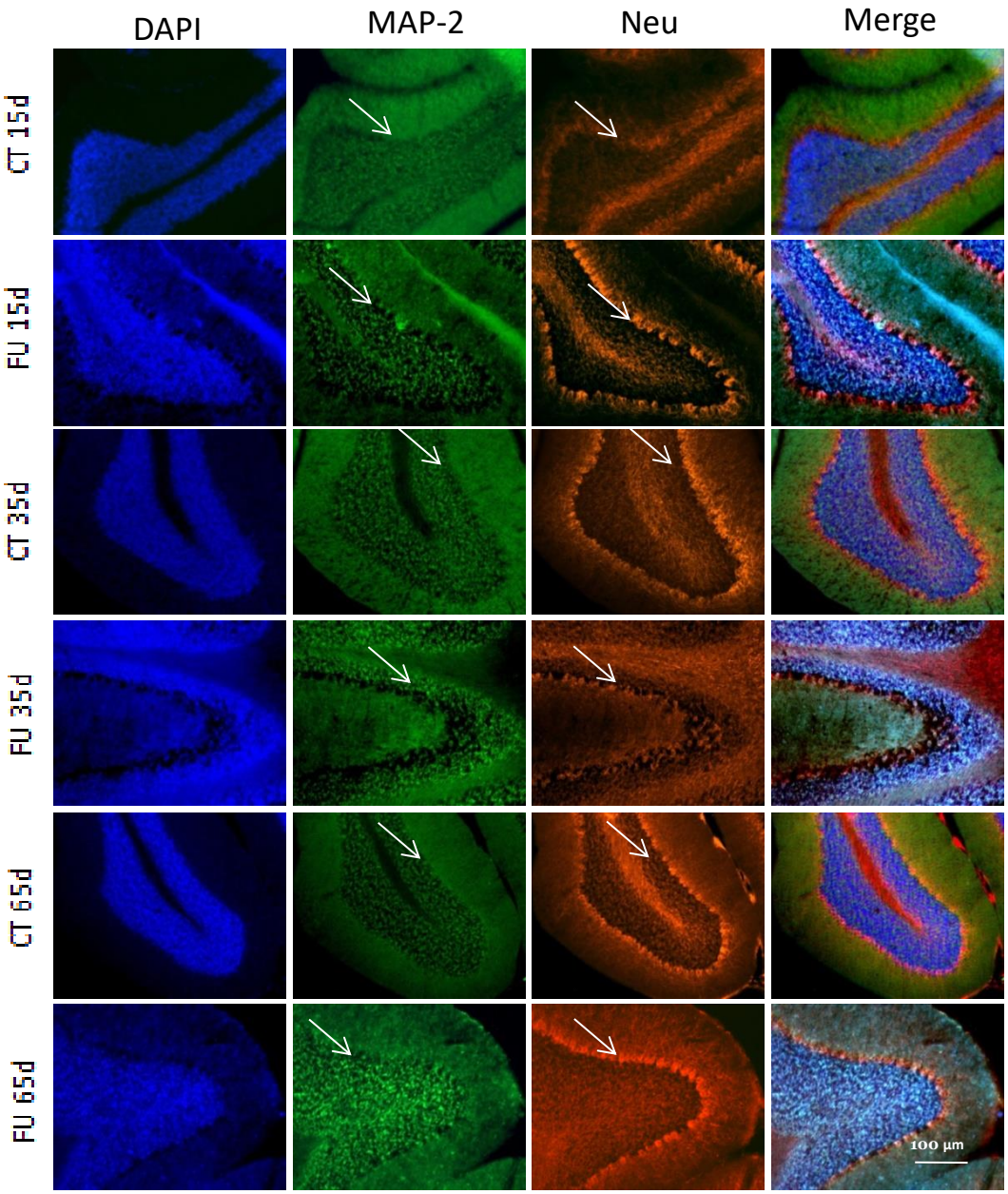


Figura 18: Fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e neurofilamentos, em animais expostos à fumaça do cigarro 4A1. As setas representam a área granular do córtex cerebelar. CT= controle, FU= fumante.

Os resultados da análise quantitativa da MAP-2 estão apresentados na figura 19. A exposição aos dois cigarros no início do período pós-natal apresentou diminuição da MAP-2 na infância (*p*<0,001 e *p*<0,0001) e na adolescência (*p*<0,001) e aumento na fase adulta (*p*<0,001).

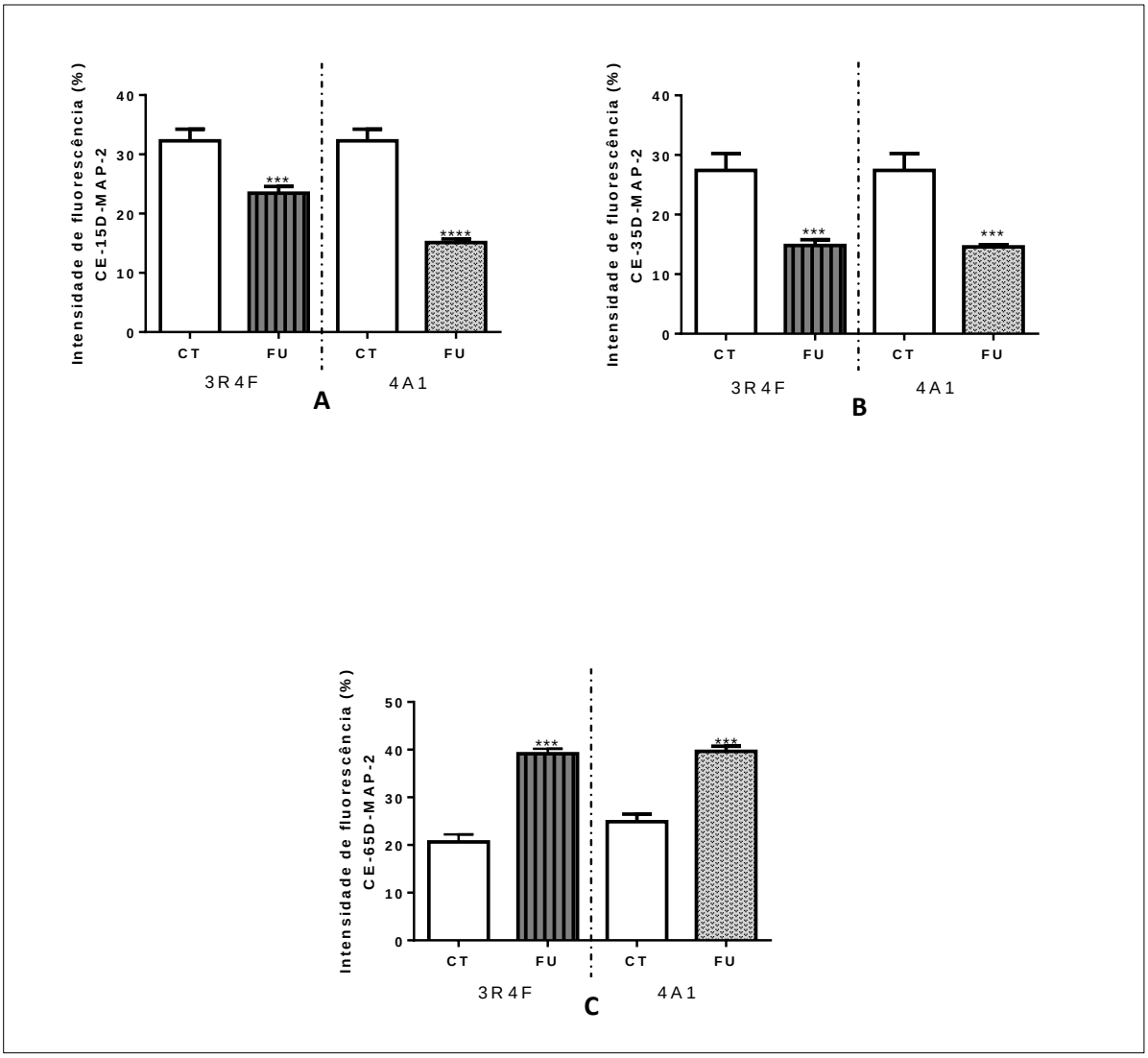


Figura 19: Análise quantitativa da MAP-2 no cerebelo. Animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e do 4A1, nas idades de 15 (A), 35 (B) e 65 dias (C). Teste "*t*" de *Student,* ****p*<0,001 e *****p*<0,0001. Dados expressos em intensidade de fluorescência em relação ao grupo controle (n=4). CT= controle, FU= fumante.

Os resultados da análise quantitativa dos Neurofilamentos estão demonstrados a seguir, pela figura 20. A exposição aos dois cigarros no início do período pós-natal apresentou diminuição da dos neurofilamentos na infância (*p*<0,001 e *p*<0,0001) e na adolescência (*p*<0,001 e *p*<0,0001), sem alteração na fase adulta.

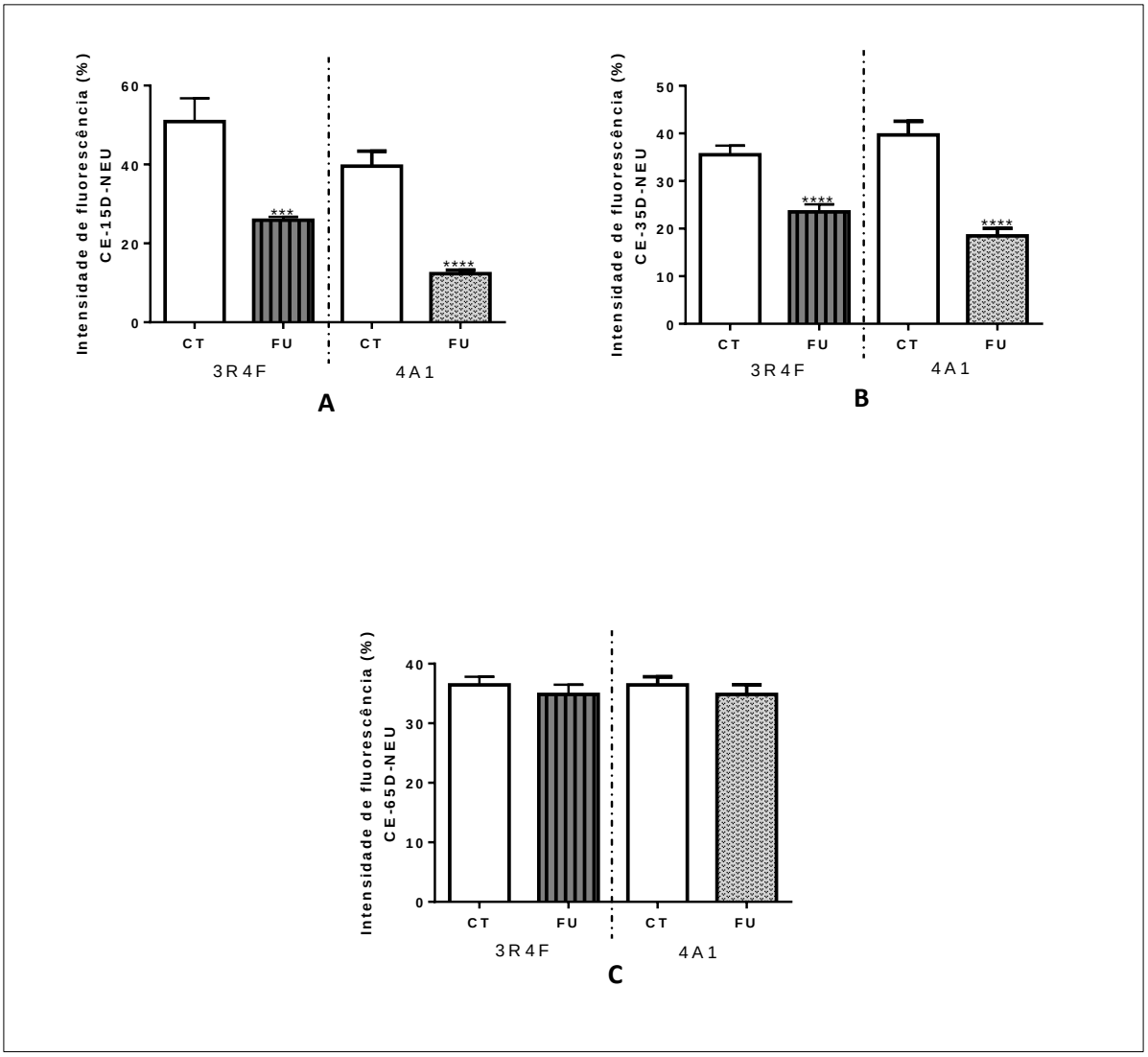


Figura 20: Análise quantitativa dos Neurofilamentos no cerebelo. Animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e do 4A1, nas idades de 15 (A), 35 (B) e 65 dias (C). Teste "*t*" de *Student,****p*<0,001 e ******p*<0,0001. Dados expressos em intensidade de fluorescência em relação ao grupo controle (n=4). CT= controle, FU= fumante.

4.3 Hipocampo

4.3.1 Análise *Western Blotting* e PCR *Real time*

Nas Figuras 21 a 26 estão apresentados os resultados das quantificações das proteínas sinapsina, sinaptotagmina, sinaptofisina, sinaptobrevina, PSD-95 e EGR-1 dos animais expostos à fumaça do cigarro. A Figura 26 mostra os resultados da expressão gênica de *Egr-1*.

A exposição à fumaça do cigarro 3R4F aumentou sinapsina na infância ($p<0,01$) e diminuiu na adolescência ($p<0,05$). Em relação à quantificação da sinaptotagmina e da sinaptofisina, constatamos um aumento somente na adolescência. Mais ainda, a PSD-95 mostrou-se diminuída somente na infância ($p<0,05$). Apesar da proteína EGR-1 mostra-se diminuída somente na adolescência ($p<0,001$), sua expressão gênica diminuiu ($p<0,01$) tanto na infância quanto na adolescência.

Nos animais expostos ao 4A1 em relação às proteínas sinápticas não ocorreram mudanças significativas, somente foi constatado um aumento ($p<0,01$) do gene *Egr-1* na infância e na adolescência.

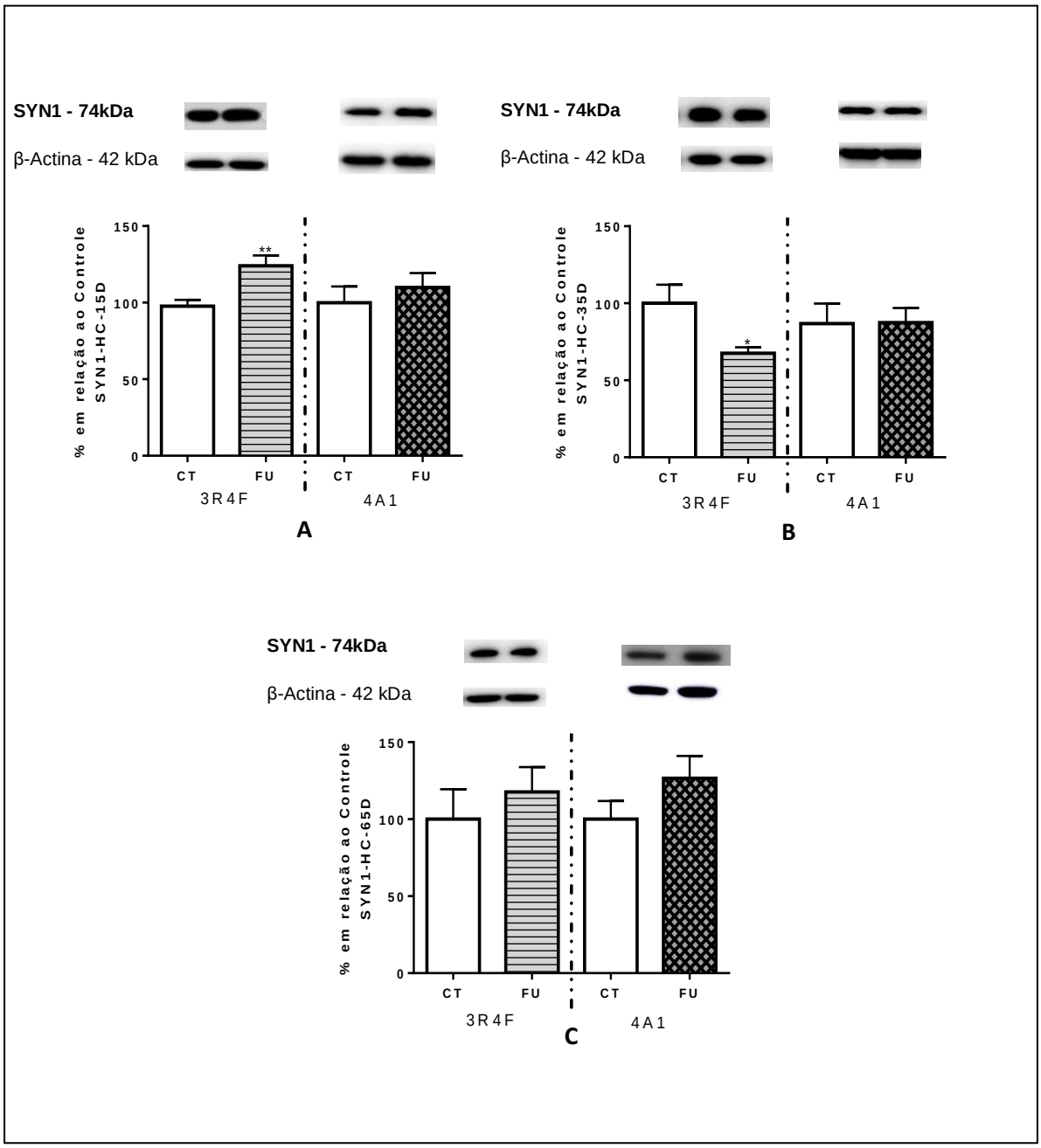


Figura 21: Análise quantitativa de sinapsina por *Western Blotting* no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A-15 dias, B-35 dias e C-65 dias. Teste "*t*" de *Student, *p*<0,05 e ***p*<0,01. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU= fumante.

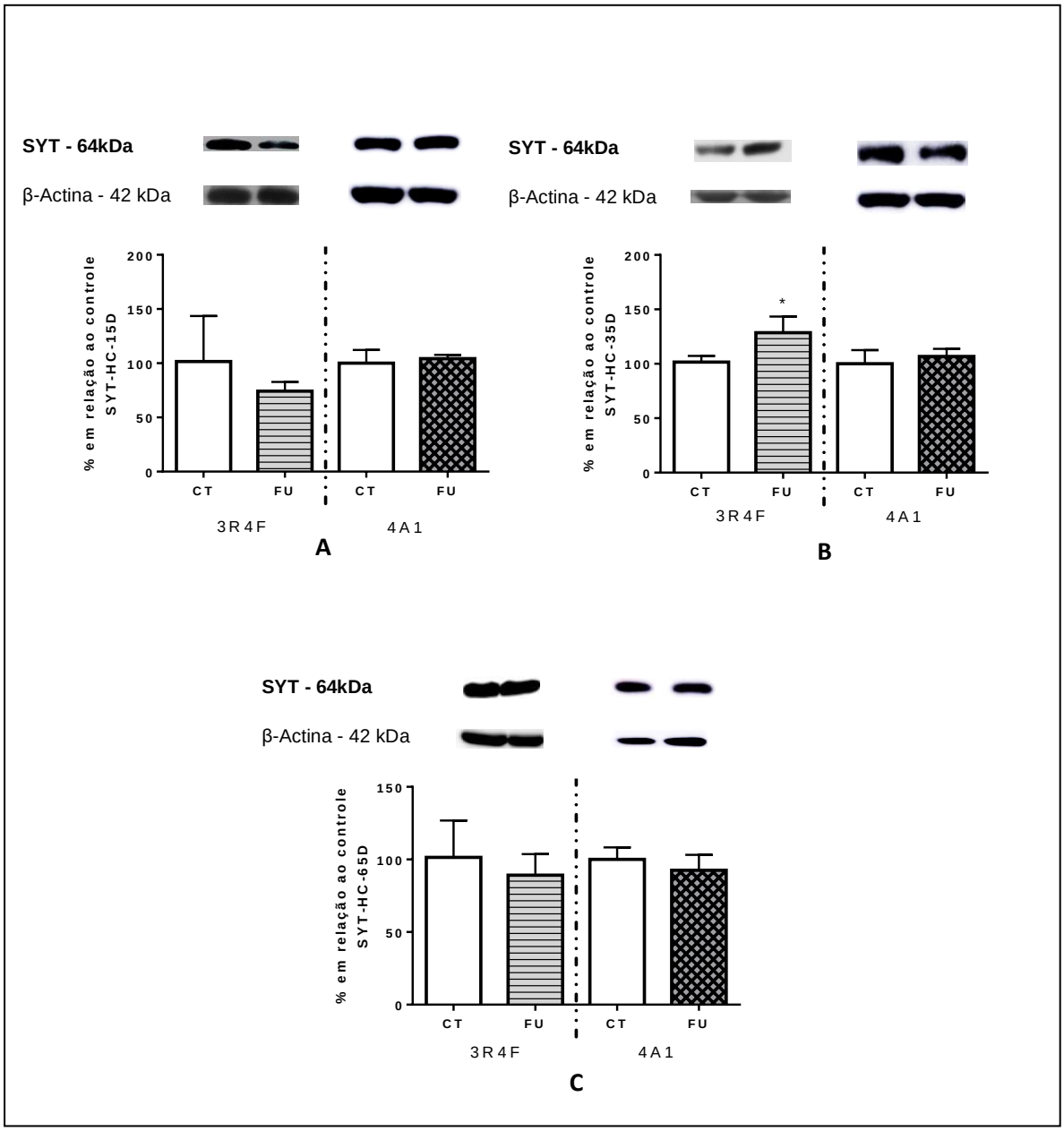


Figura 22: Análise quantitativa de sinaptotagmina por *Western Blotting* no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A-15 dias, B-35 dias e C-65 dias. Teste "*t*" de *Student,*$*p<0,05$ e $**p<0,01$. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU= fumante.

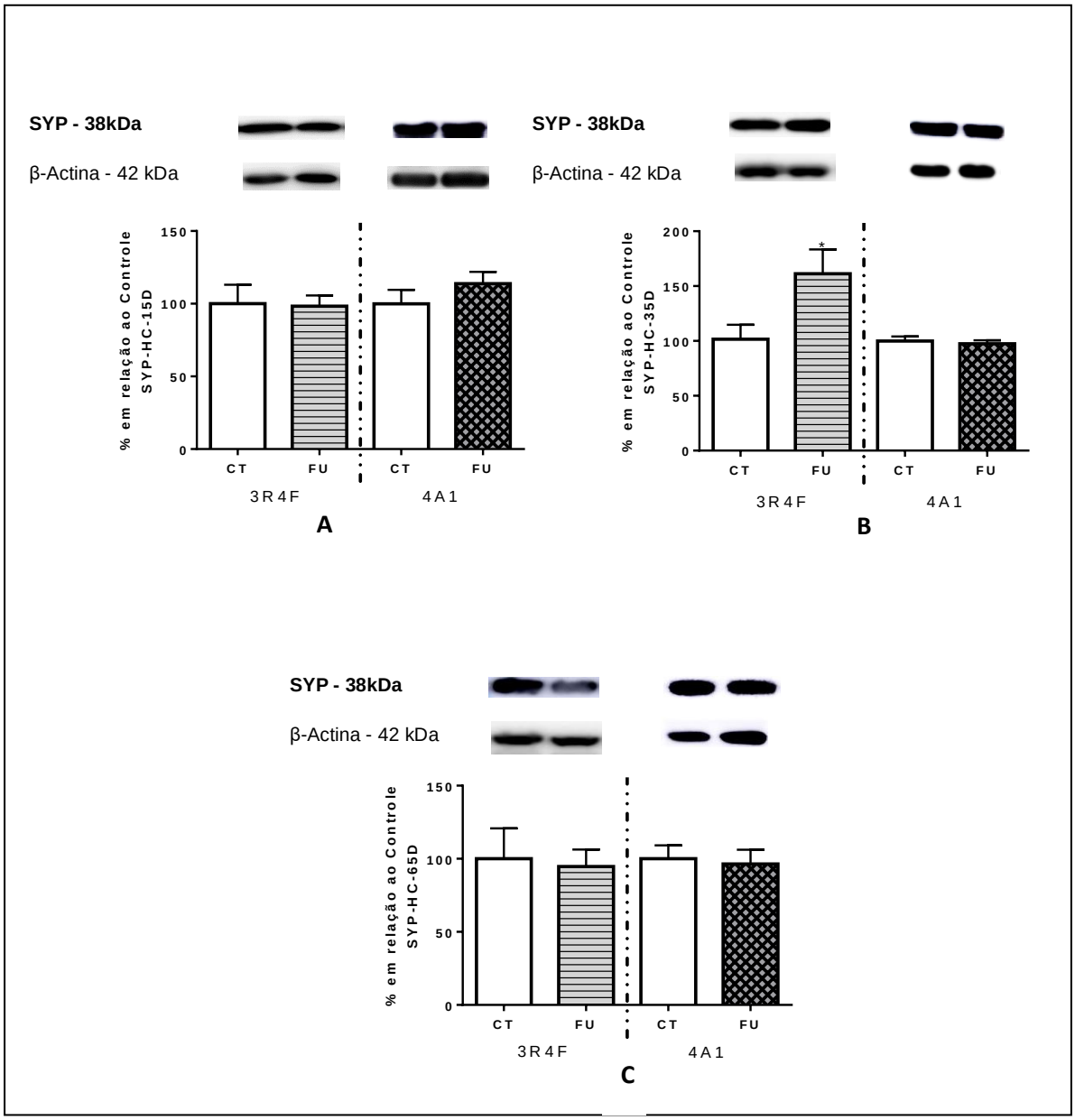


Figura 23: Análise quantitativa de sinaptofisina por *Western Blotting* no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A-15 dias, B-35 dias e C-65 dias. Teste "*t*" de *Student,* ***p*<0,01. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU= fumante.

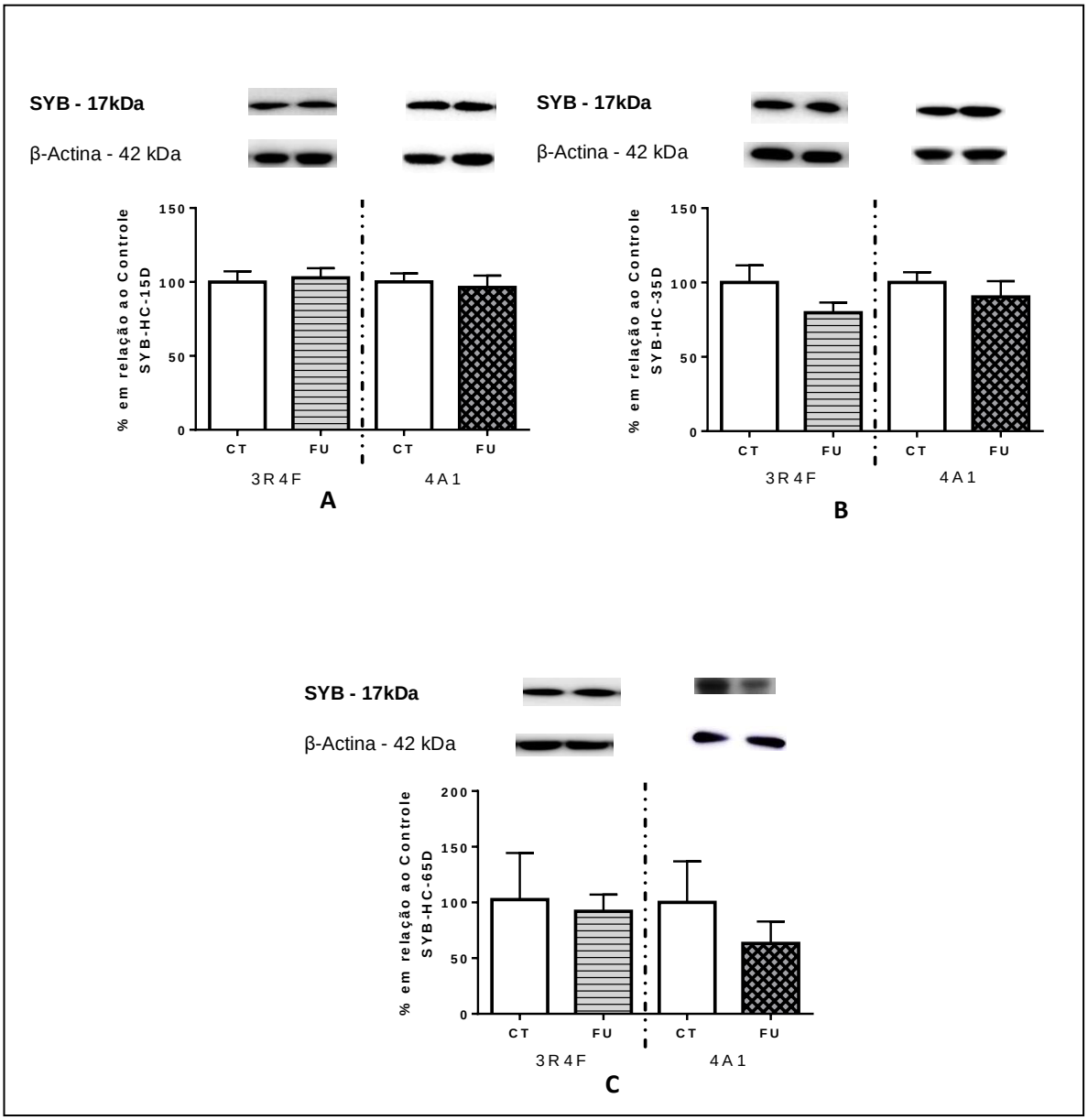


Figura 24: Análise quantitativa de sinaptobrevina por *Western Blotting* no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A-15 dias, B-35 dias e C-65 dias. Teste "*t*" de *Student,* p*<0,05 e ***p*<0,01. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU= fumante.

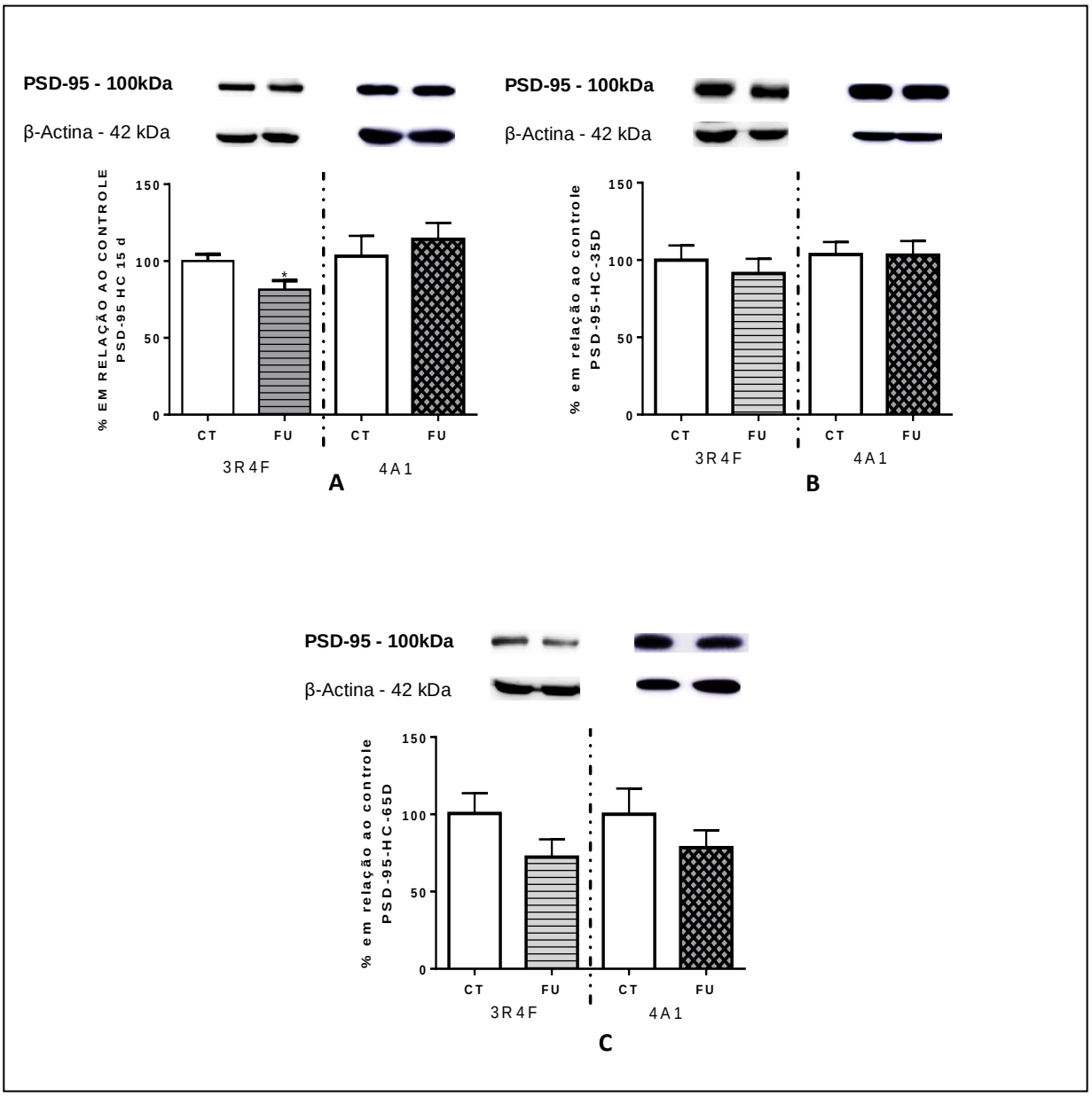


Figura 25: Análise quantitativa de PSD-95 por *Western Blotting* no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A-15 dias, B-35 dias e C-65 dias. Teste "*t*" de *Student, *p*<0,05 e ***p*<0,01. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU = fumante.

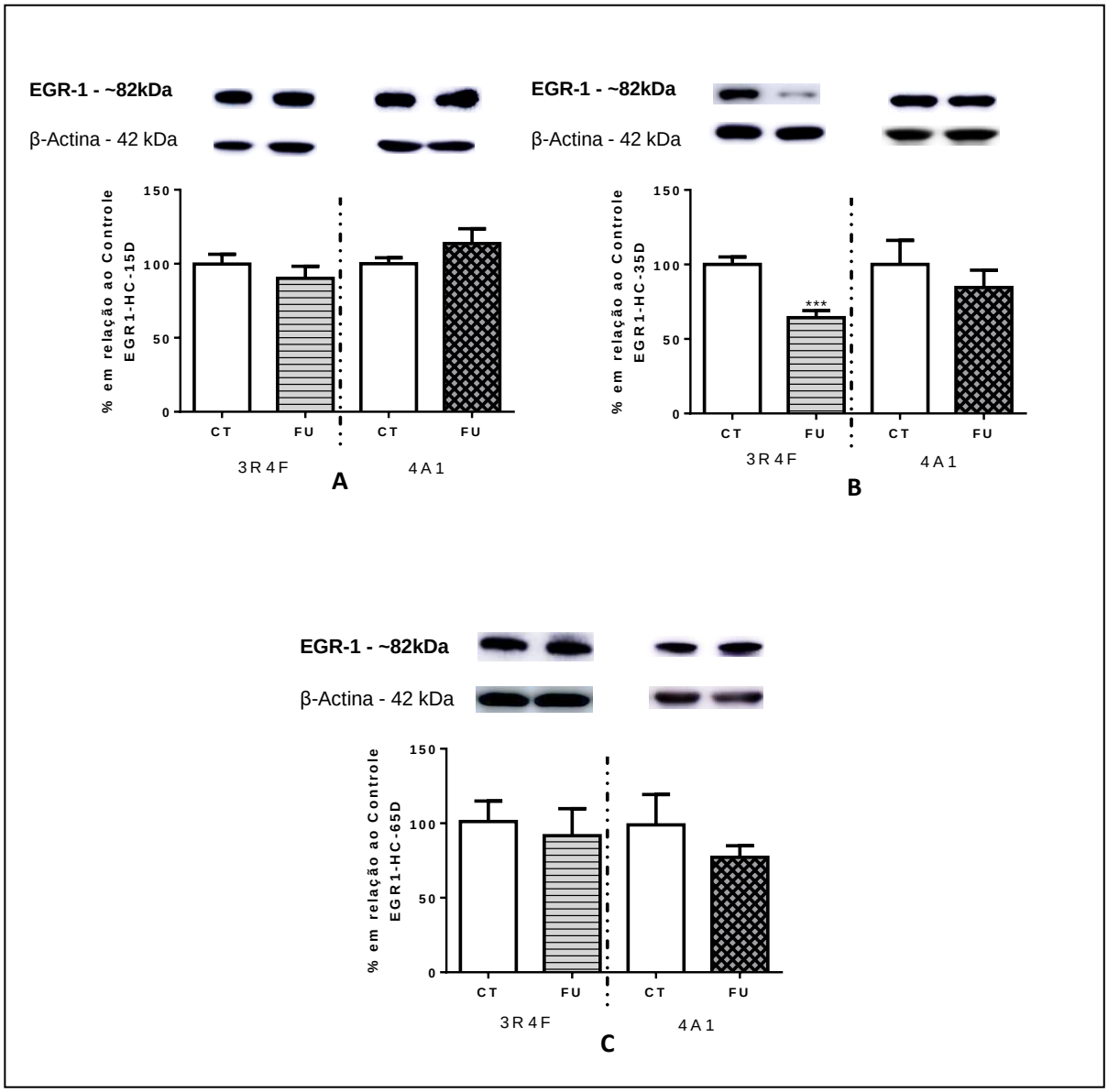


Figura 26: Análise quantitativa de EGR-1 por *Western Blotting* no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A-15 dias, B-35 dias e C-65 dias. Teste "*t*" de *Student,* ****p*<0,001. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU = fumante.

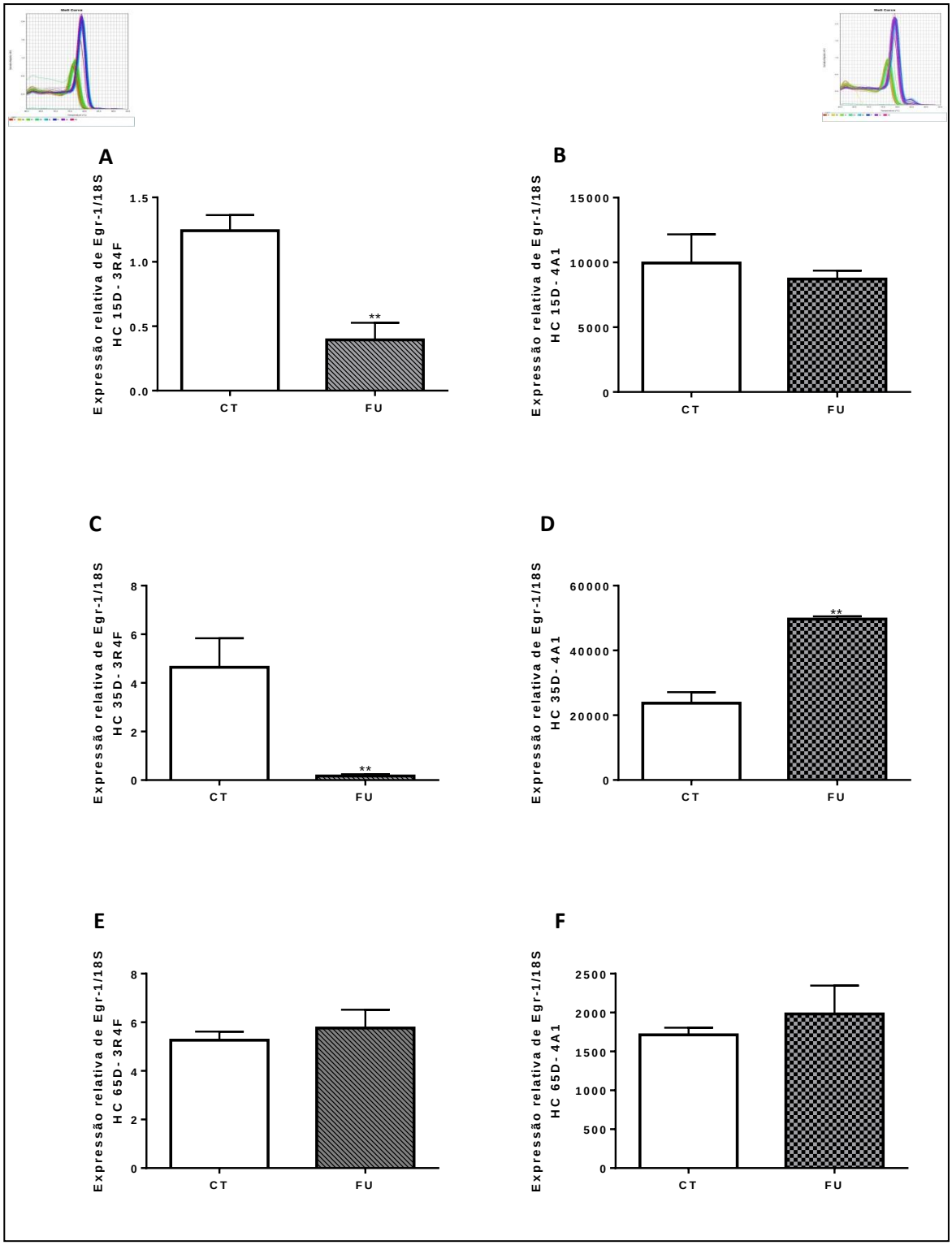
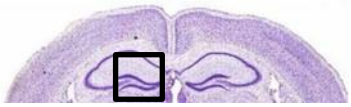


Figura 27: Análise quantitativa do gene *Egr-1* por PCR *Real time* no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A e B- 15 dias; C e D 35 dias; E e F 65 dias. Teste "*t*" de *Student,* ***p*<0,01. As imagens nos campos superiores da figura representam as curvas de Melt. Dados expressos em ΔΔCt em relação ao gene endógeno *18S* (n=4). CT= controle, FU= fumante.

4.3.2 Análise de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e Neurofilamentos.

As figuras 28 e 29 mostram as fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e Neurofilamentos, no hipocampo.



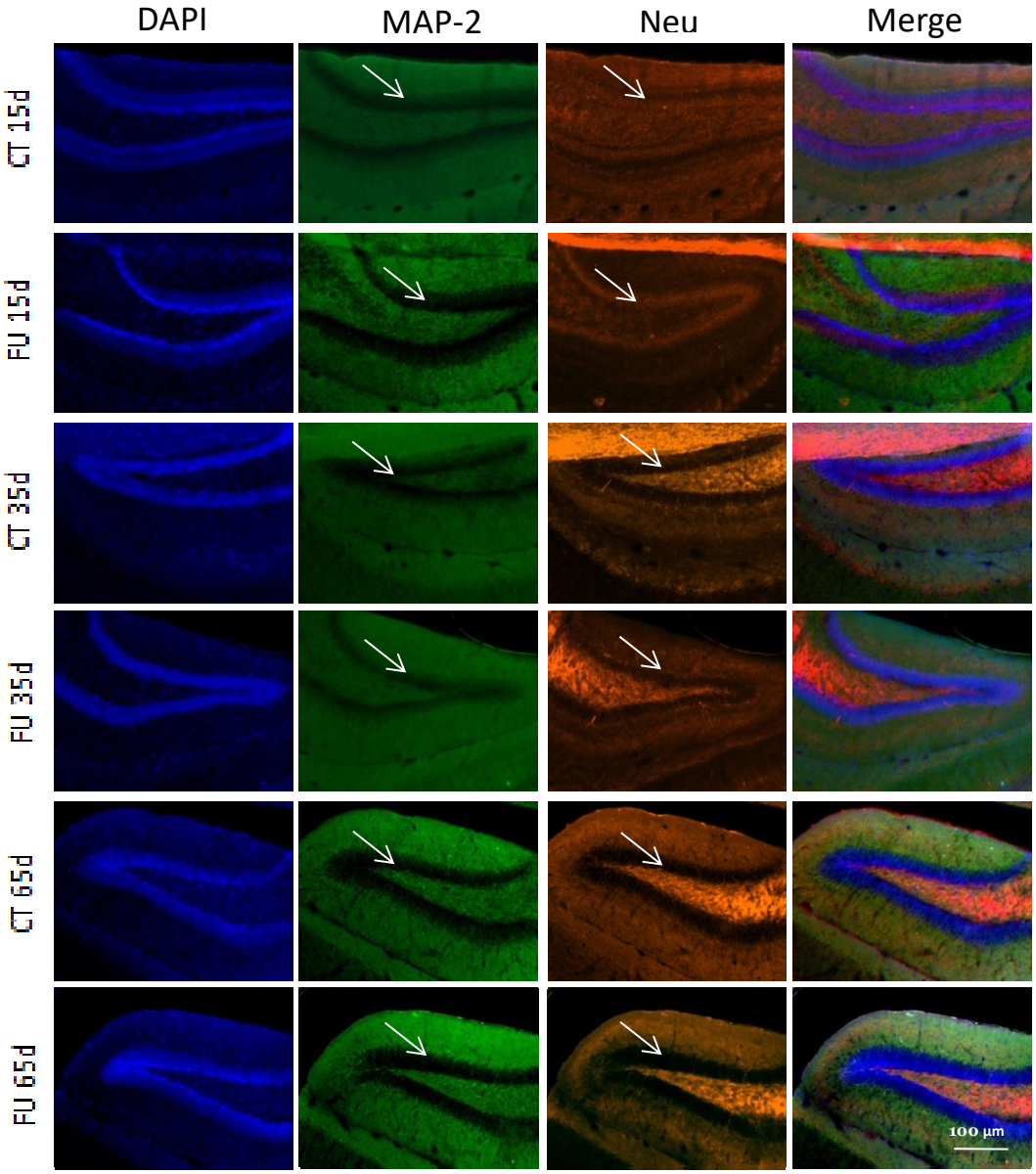


Figura 28: Fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e neurofilamentos, em animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F. As setas indicam a área do giro denteado. CT= controle, FU= fumante.

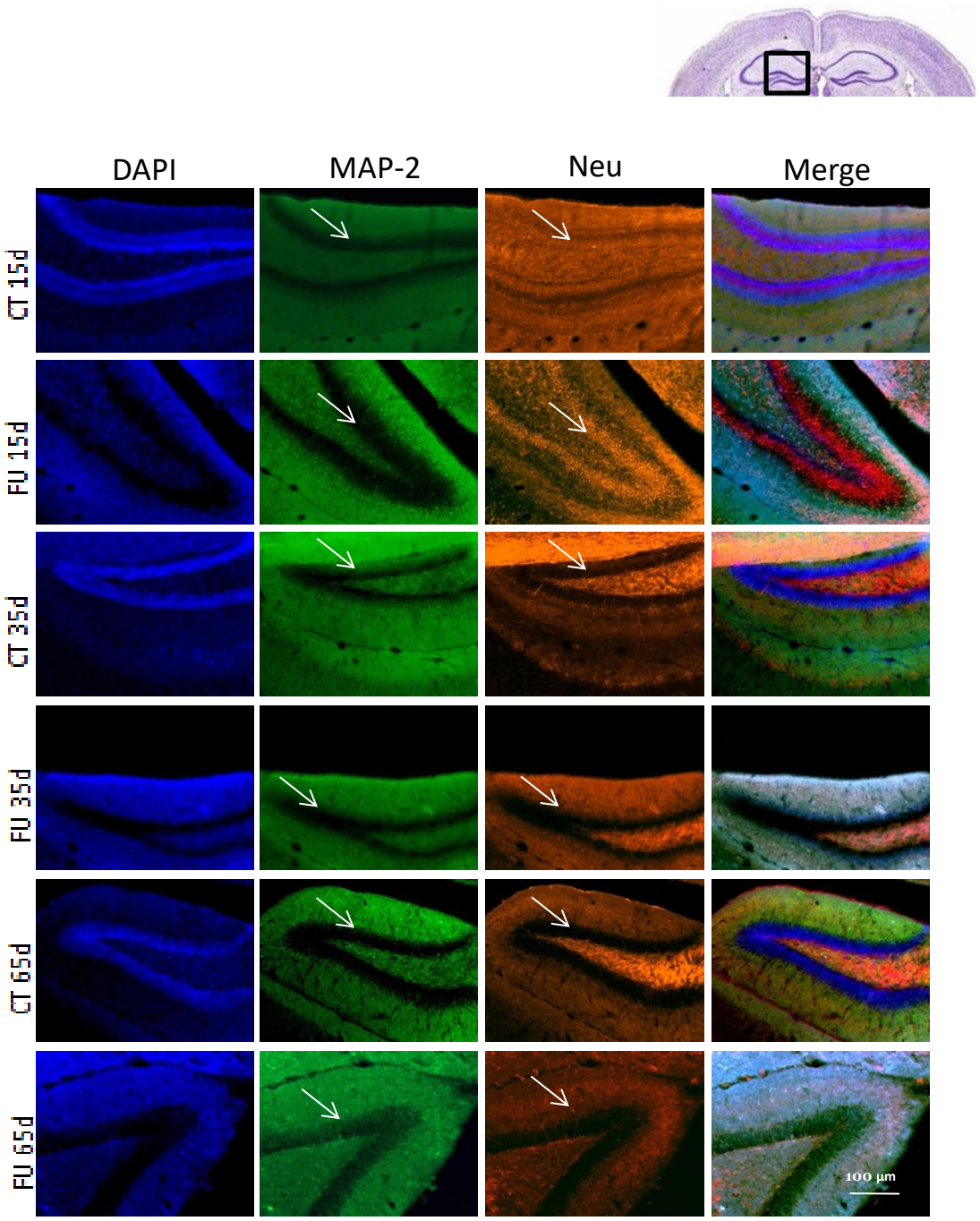


Figura 29: Fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e neurofilamentos, em animais expostos à fumaça do cigarro 4A1. As setas indicam a área do giro denteado. CT= controle, FU= fumante.

Os resultados da análise quantitativa da MAP-2 estão apresentados na figura 30. O cigarro 3R4F aumentou a MAP-2 na infância (*p*<0,0001), na adolescência (*p*<0,0001) e na fase adulta (*p*<0,001). No entanto, o cigarro 4A1 causou diminuição na infância (*p*<0,001) e aumento nas outras duas idades avaliadas (*p*<0,01 e *p*<0,001).

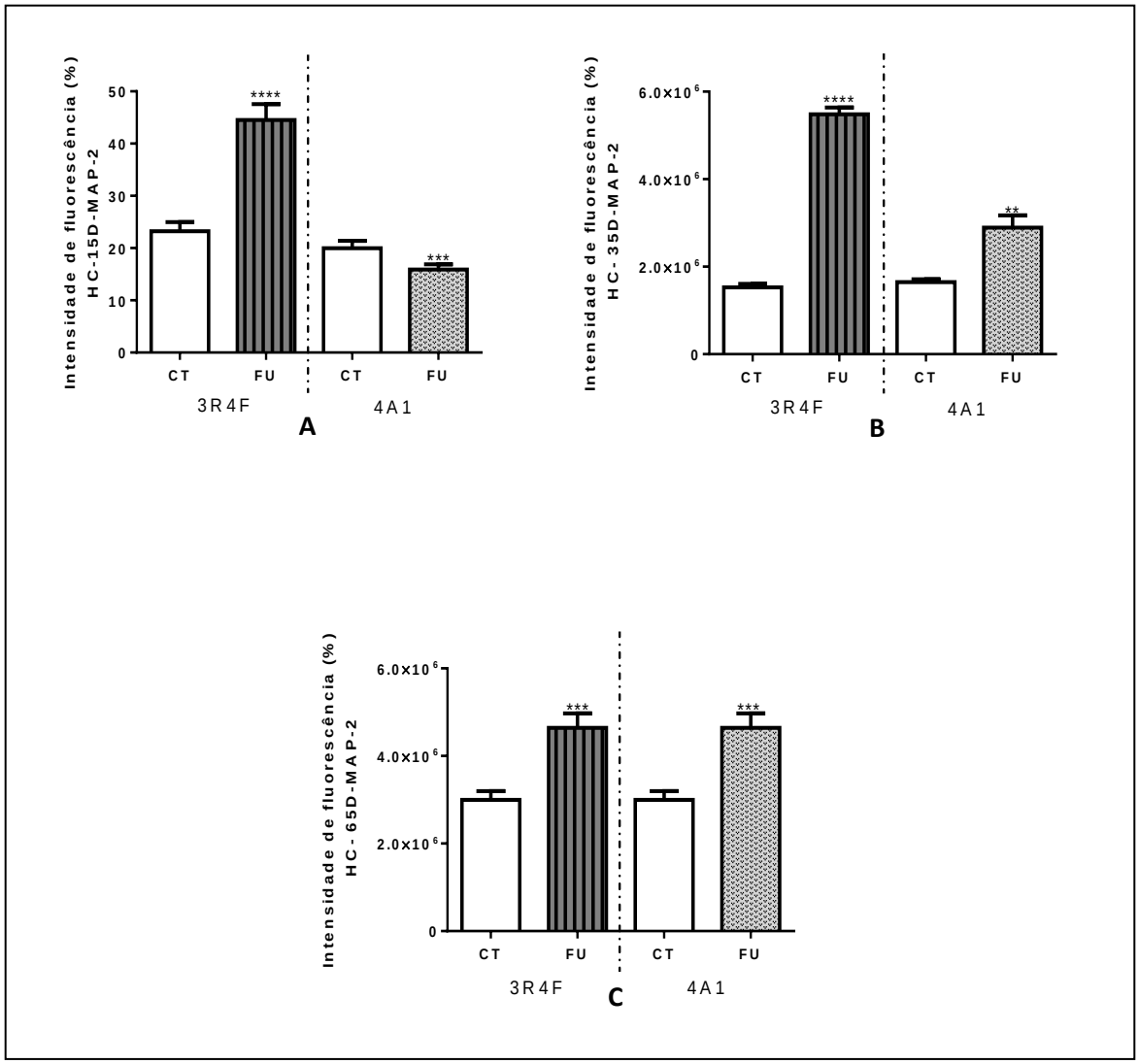


Figura 30: Análise quantitativa da proteína MAP-2 no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e do 4A1, nas idades de 15 (A), 35 (B) e 65 dias (C). Teste "*t*" de *Student,* ***p*<0,01, ****p*<0,001 e *****p*<0,0001. Dados expressos em intensidade de fluorescência em relação ao grupo controle (n=4). CT= controle, FU= fumante

Os resultados da análise quantitativa dos Neurofilamentos estão apresentados na figura 31. O cigarro 3R4F diminuiu os neurofilamentos na infância (*p*<0,0001), porém causou aumento na adolescência (*p*<0,001) e na fase adulta (*p*<0,01). Já o 4A1 diminui os neurofilamentos tanto na infância (*p*<0,0001) quanto na adolescência (*p*<0,001), porém aumentou na fase adulta (*p*<0,01).

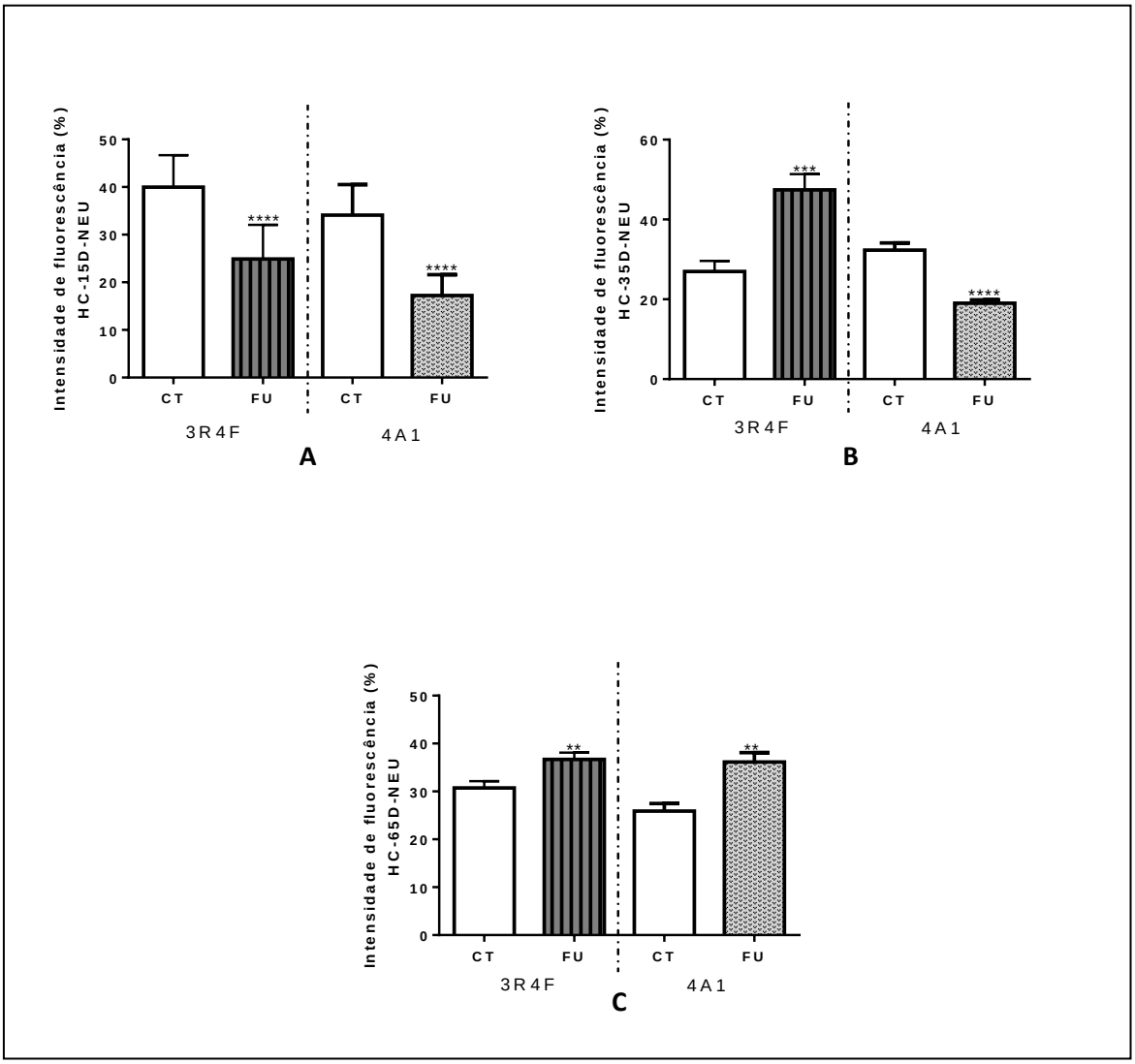


Figura 31: Análise quantitativa dos Neurofilamentos no hipocampo de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e do 4A1, nas idades de 15 (a), 35 (b) e 65 dias (c). Teste "*t*" de *Student,* ***p*<0,01, ****p*<0,001 e *****p*<0,0001. Dados expressos em intensidade de fluorescência em relação ao grupo controle (n=4). CT= controle, FU= fumante.

4.4 Tronco Encefálico

4.4.1 Análise *Western Blotting* e PCR *Real time*

Nas Figuras 32 a 37 estão apresentados os resultados das quantificações das proteínas sinapsina, sinaptotagmina, sinaptofisina, sinaptobrevina, PSD-95 e EGR-1 dos animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F e ao 4A1 em relação aos animais do grupo controle. A figura 38 apresenta a expressão gênica de *Egr-1*.

Houve aumento estatisticamente significativo na quantificação da sinapsina de animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F no início do período pós-natal na adolescência (p <0,05) e uma diminuição na fase adulta (p<0,05). Já a quantificação do fator de transcrição EGR-1 mostrou-se aumentada na fase adulta (p<0,01) e sua expressão gênica aumentou somente na fase adulta (p<0,01).

Os animais expostos ao cigarro 4A1 apresentaram diminuição de sinaptotagmina na fase adulta (p<0,05) e aumento de sinaptobrevina na adolescência (p<0,05) e na fase adulta (p<0,01). Mais ainda, a proteína EGR-1 aumentou na fase adulta (p<0,05) e sua expressão gênica mostrou-se aumentada na infância (p<0,05) e na adolescência (p<0,05).

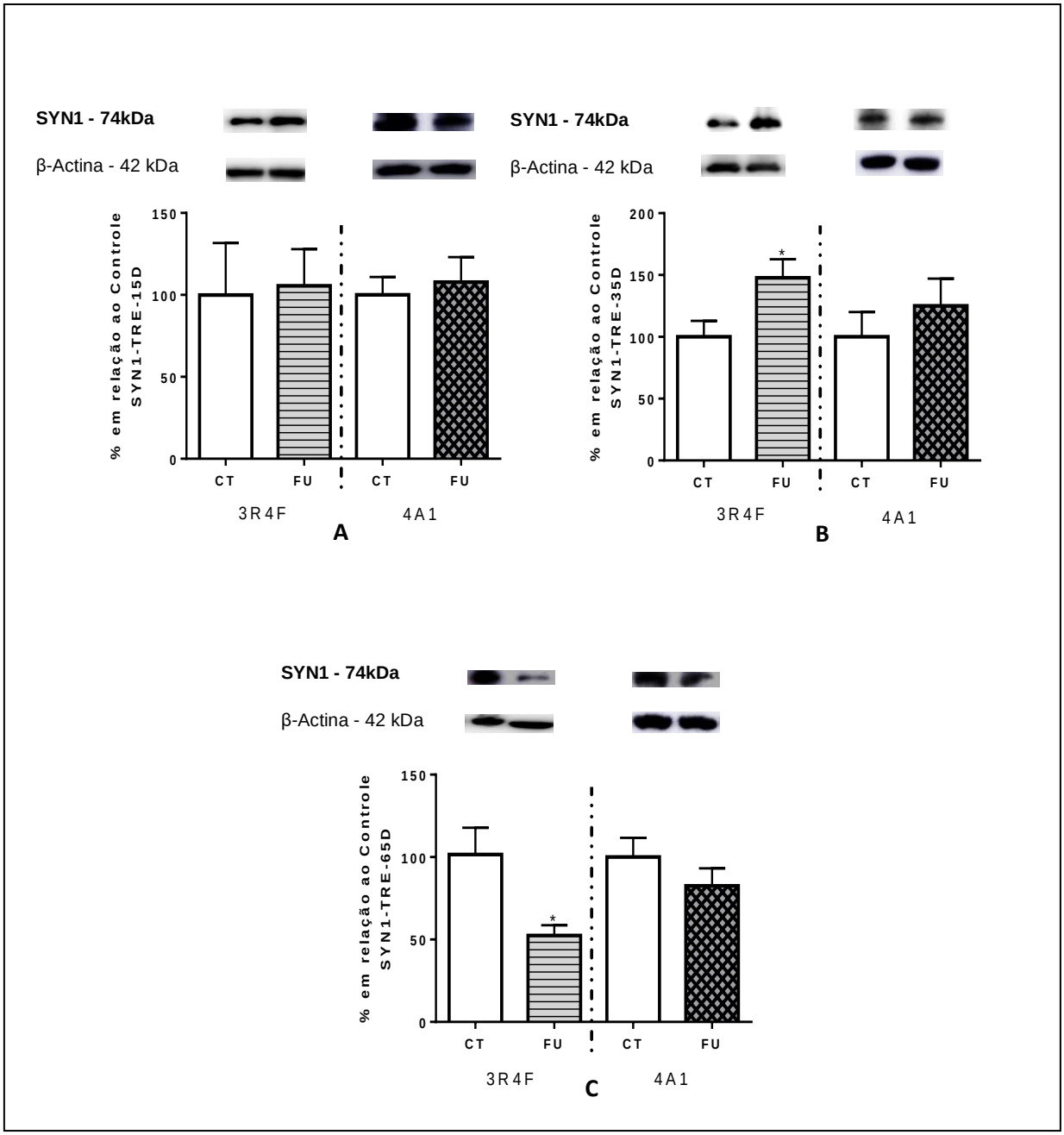


Figura 32: Análise quantitativa de sinapsina por *Western Blotting* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A-15 dias, B-35 dias e C-65 dias.Teste "*t*" de *Student, *p*<0,05. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU= fumante.

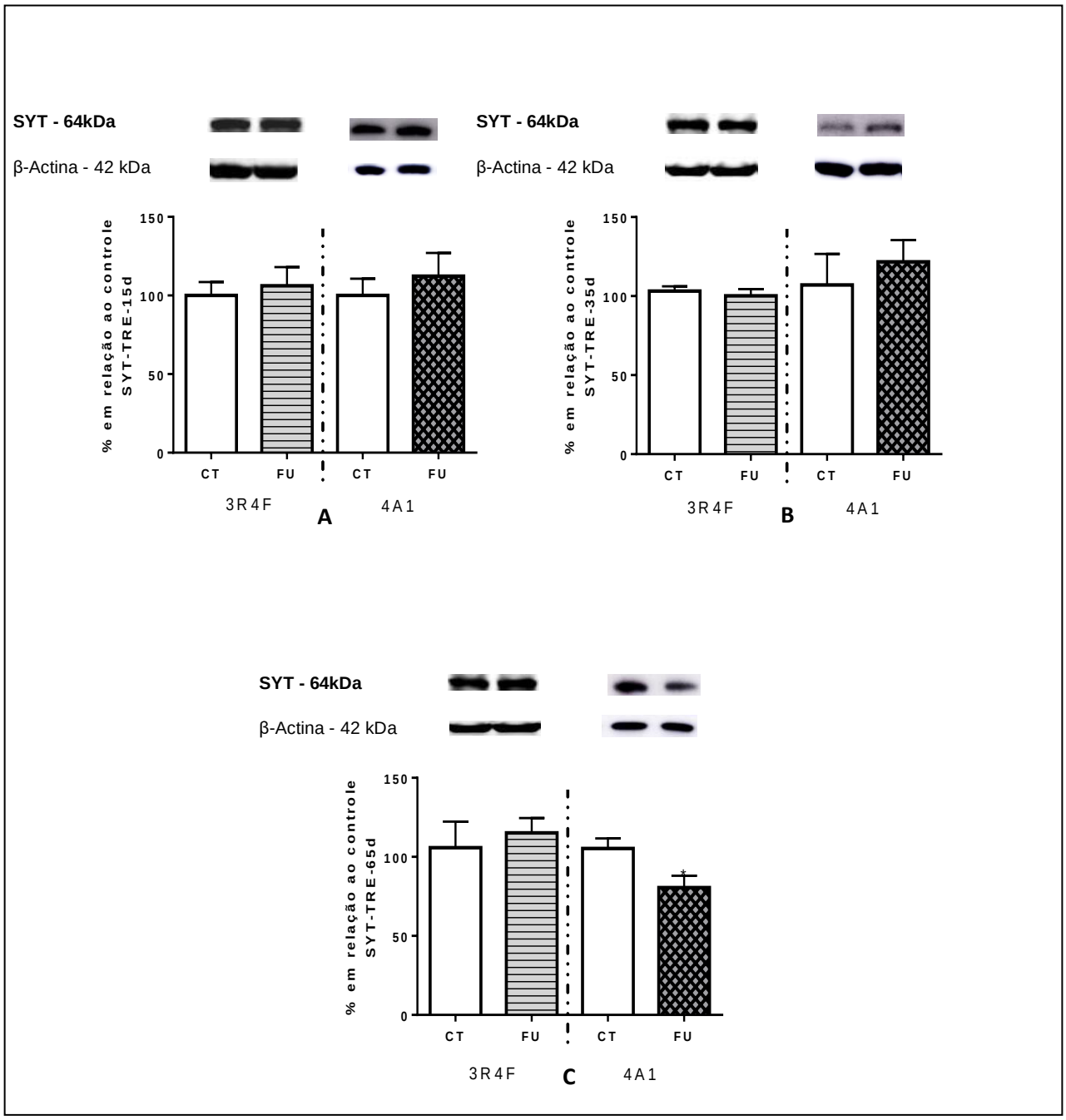


Figura 33: Análise quantitativa de sinaptotagmina por *Western Blotting* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A-15 dias, B-35 dias e C-65 dias. Teste "*t*" de *Student, *p*<0,05. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle (n=6). CT= controle, FU= fumante.

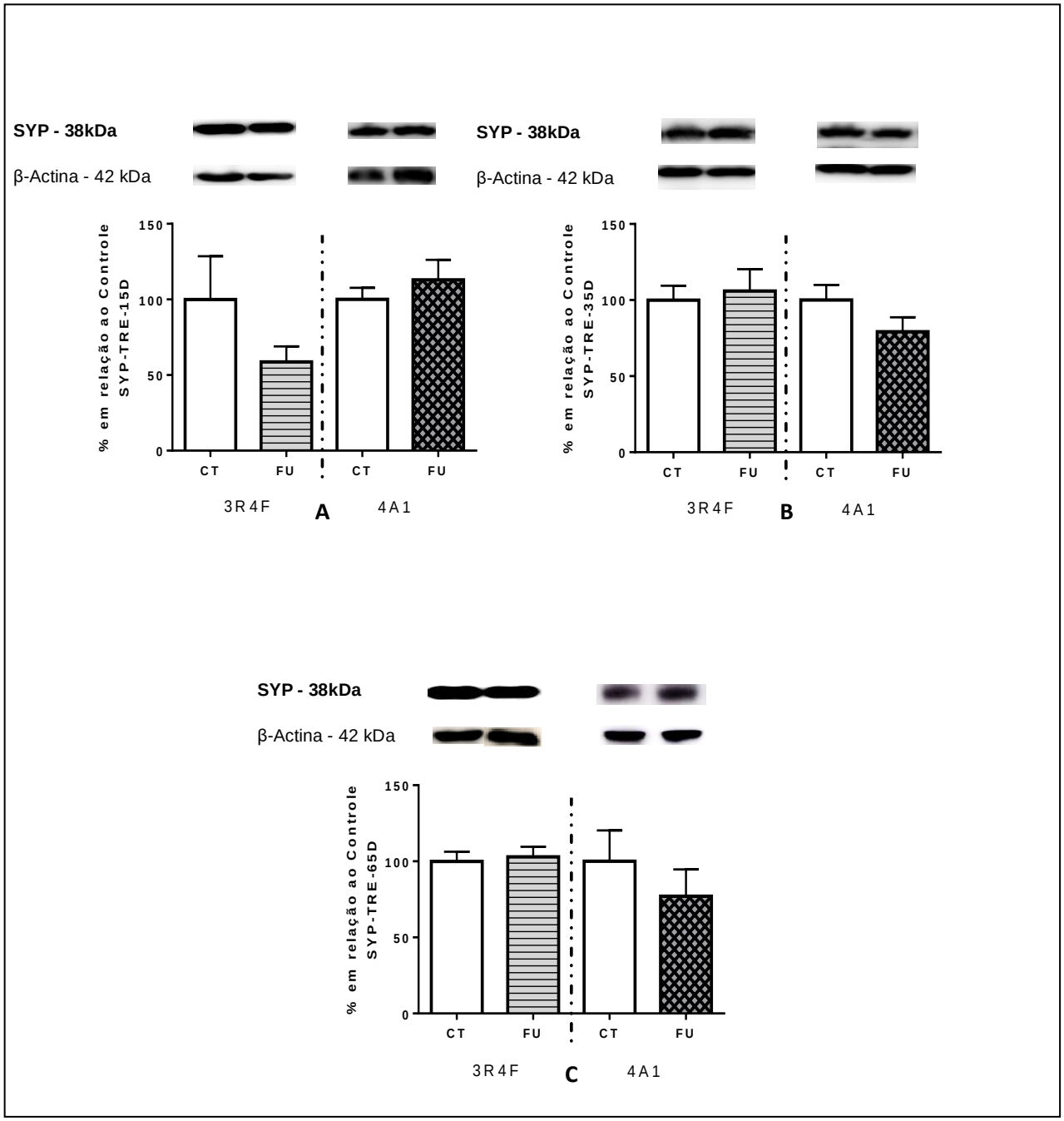


Figura 34: Análise quantitativa de sinaptofisina por *Western Blotting* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A-15 dias, B-35 dias e C-65 dias. Teste "*t*" de *Student, p*>0,05. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle (n=6). CT: Controle, FU: Fumante.

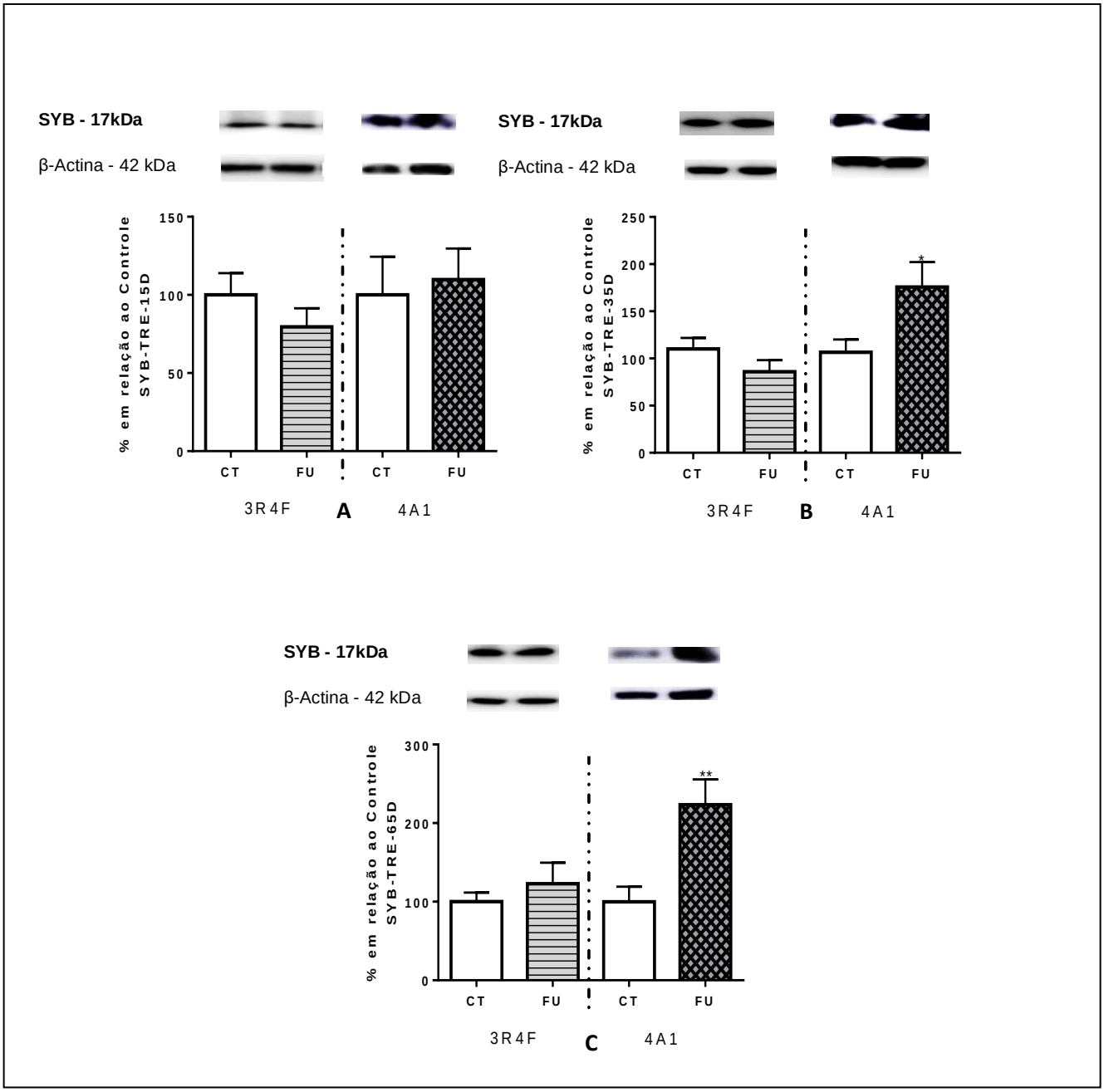


Figura 35: Análise quantitativa de sinaptobrevina por *Western Blotting* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A-15 dias, B-35 dias e C-65 dias. Teste "*t*" de *Student, *p*<0,05 e ***p*<0,01. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle (n=6). CT: Controle, FU: Fumante.

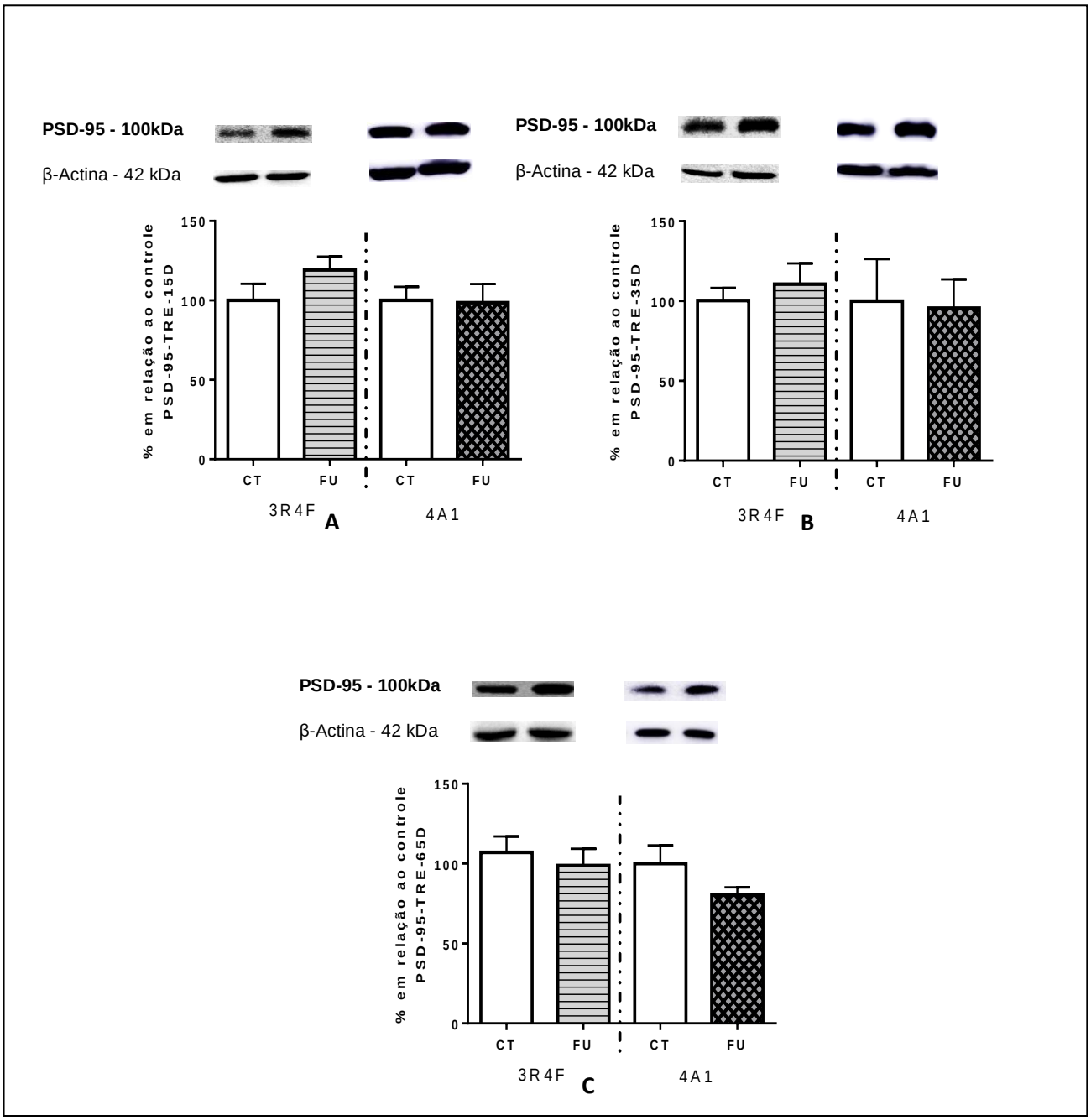


Figura 36: Análise quantitativa de PSD-95 por *Western Blotting* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A-15 dias, B-35 dias e C-65 dias. Teste "*t*" de *Student, p*>0,05. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle (n=6). CT: Controle, FU: Fumante.

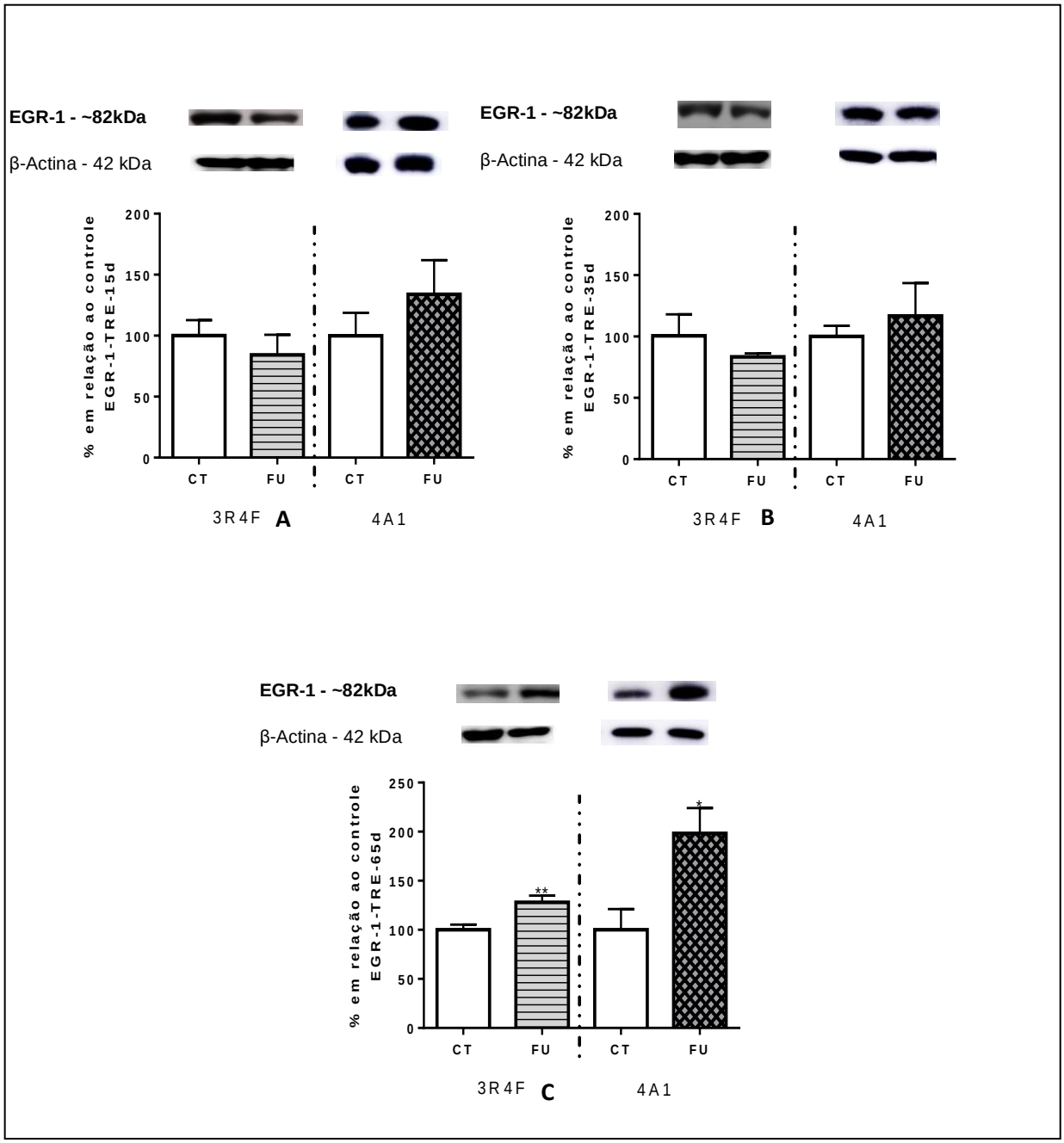


Figura 37: Análise quantitativa de EGR-1 por *Western Blotting* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A-15 dias, B-35 dias e C-65 dias. Teste "*t*" de *Student, *p*<0,05 e ***p*<0,01. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle (n=6). CT: Controle, FU: Fumante.

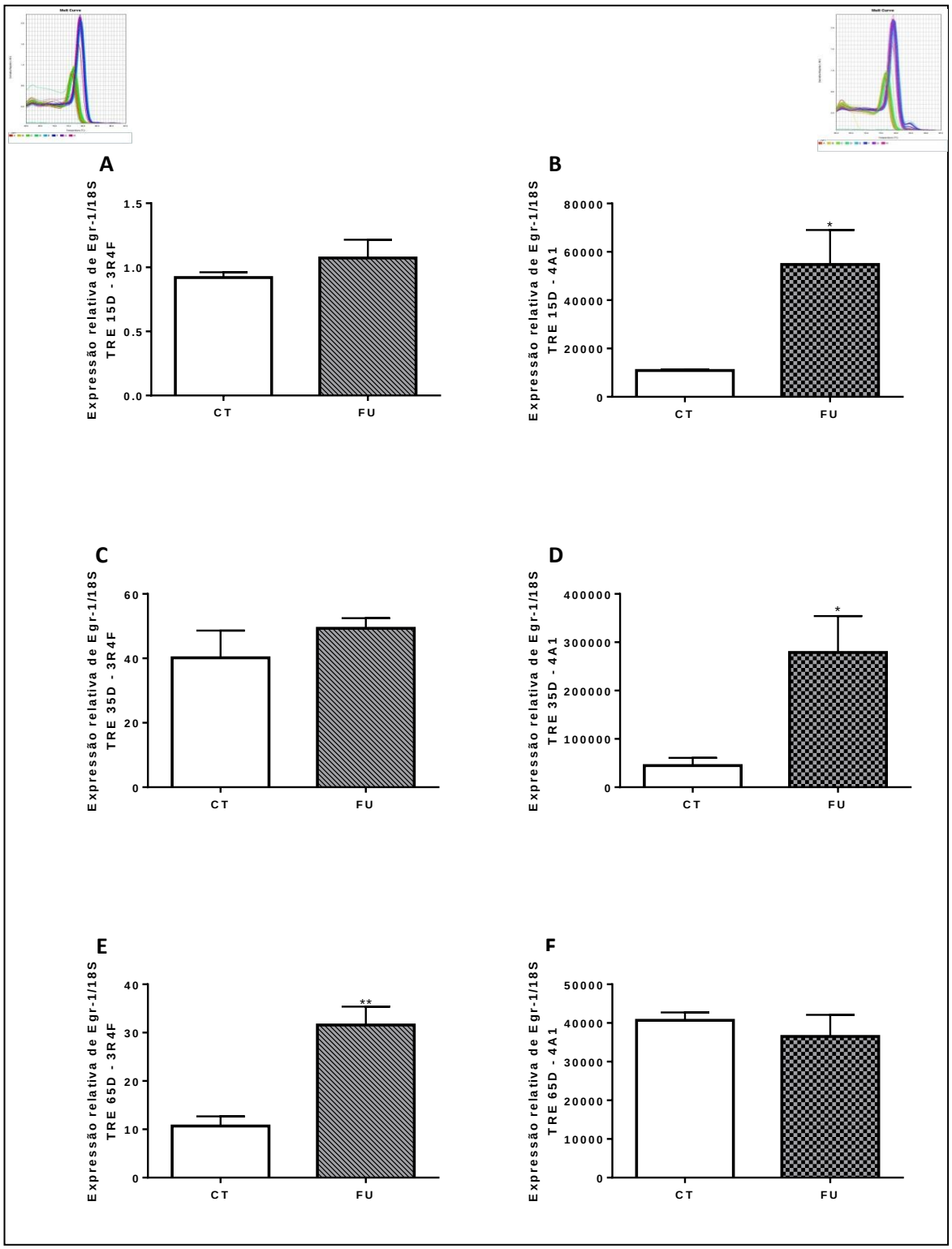
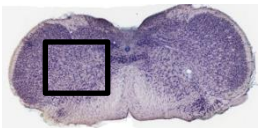


Figura 38: Análise quantitativa do gene *Egr-1* por PCR *Real time* no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e 4A1. A e B- 15 dias; C e D 35 dias; E e F 65 dias. Teste "*t*" de *Student,* **p*<0,05 e ***p*<0,01. As imagens nos campos superiores da figura representam as curvas de Melt. Dados expressos em ΔΔCt em relação ao gene endógeno *18S* (n=4). CT= controle, FU= fumante.

4.4.2 Análise de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e Neurofilamentos.

As figuras 39 e 40 mostram as fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e Neurofilamentos, no tronco encefálico.



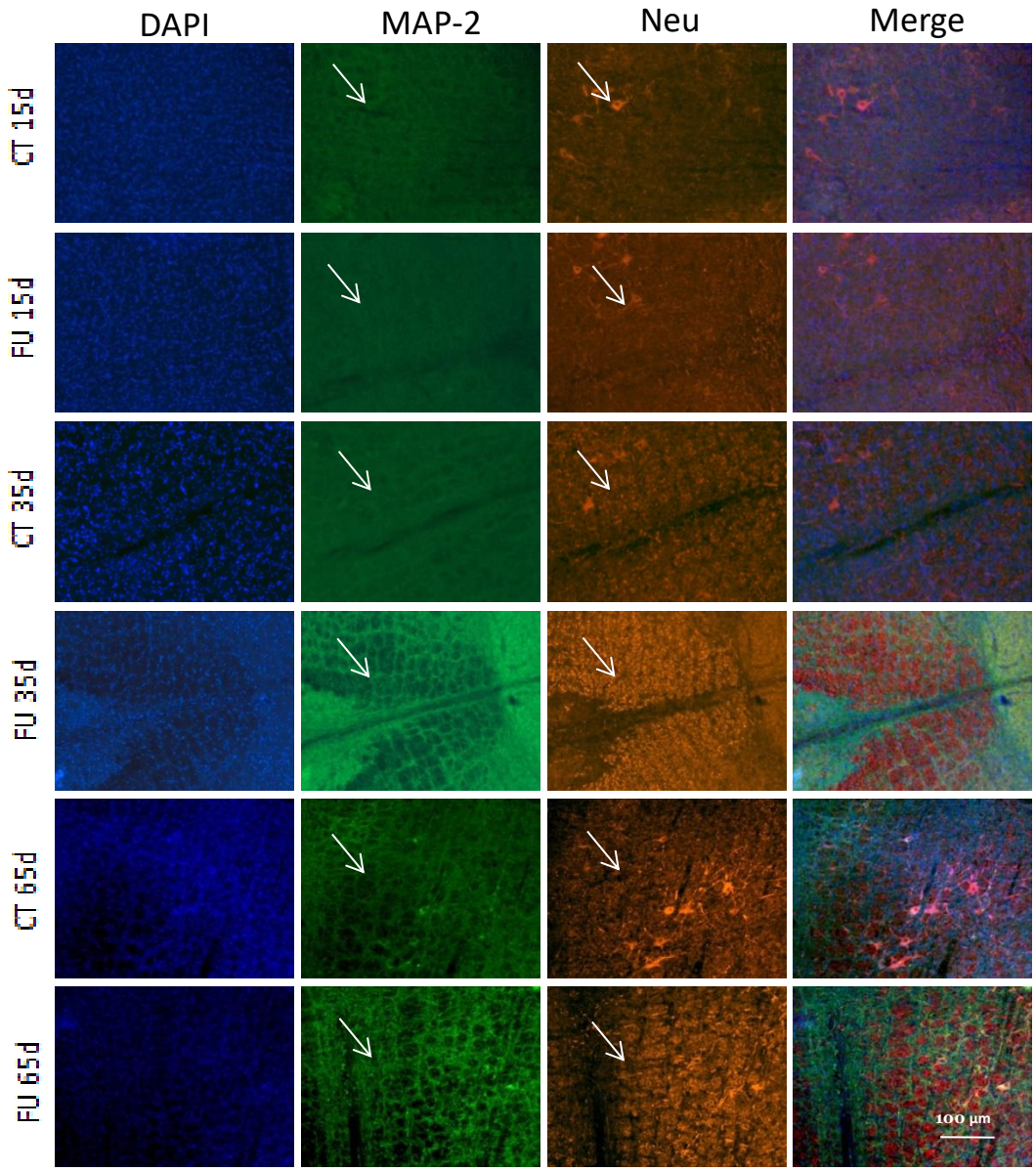
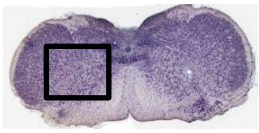


Figura 39: Fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e neurofilamentos, em animais expostos à fumaça do cigarro 3R4F. As setas indicam a área da formação reticular CT= controle, FU= fumante.



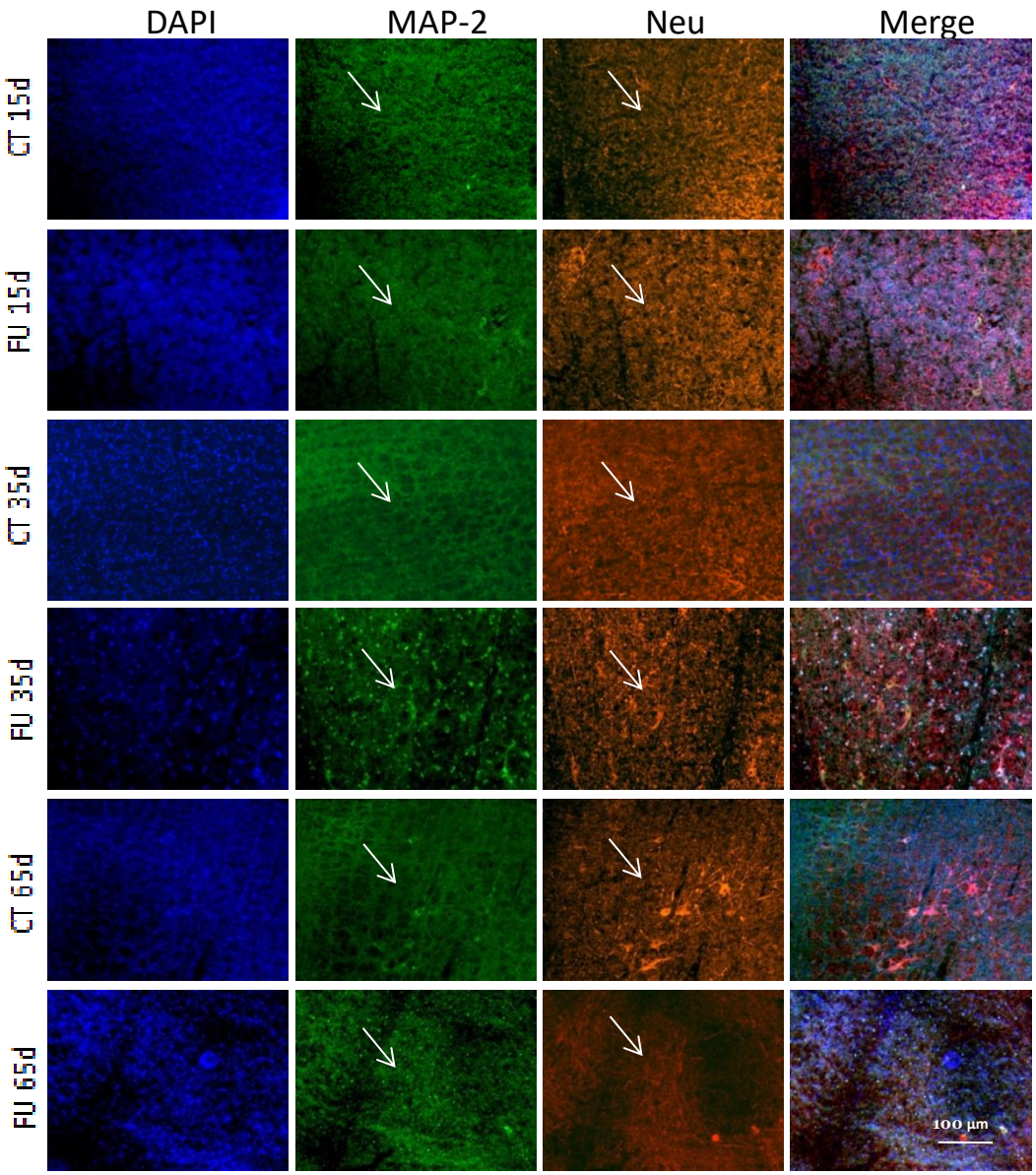


Figura 40: Fotos representativas das análises de imunofluorescência das proteínas MAP-2 e neurofilamentos, em animais expostos à fumaça do cigarro 4A1. As setas indicam a área da formação reticular. CT= controle, FU= fumante.

Os resultados da análise quantitativa da MAP-2 estão apresentados na figura 41. Foi detectado aumento de MAP-2 na adolescência (p<0,01) e fase adulta (p<0,05) após exposição ao cigarro 3R4F. No entanto, a exposição ao 4A1 diminuiu MAP-2 na adolescência (p<0,001).

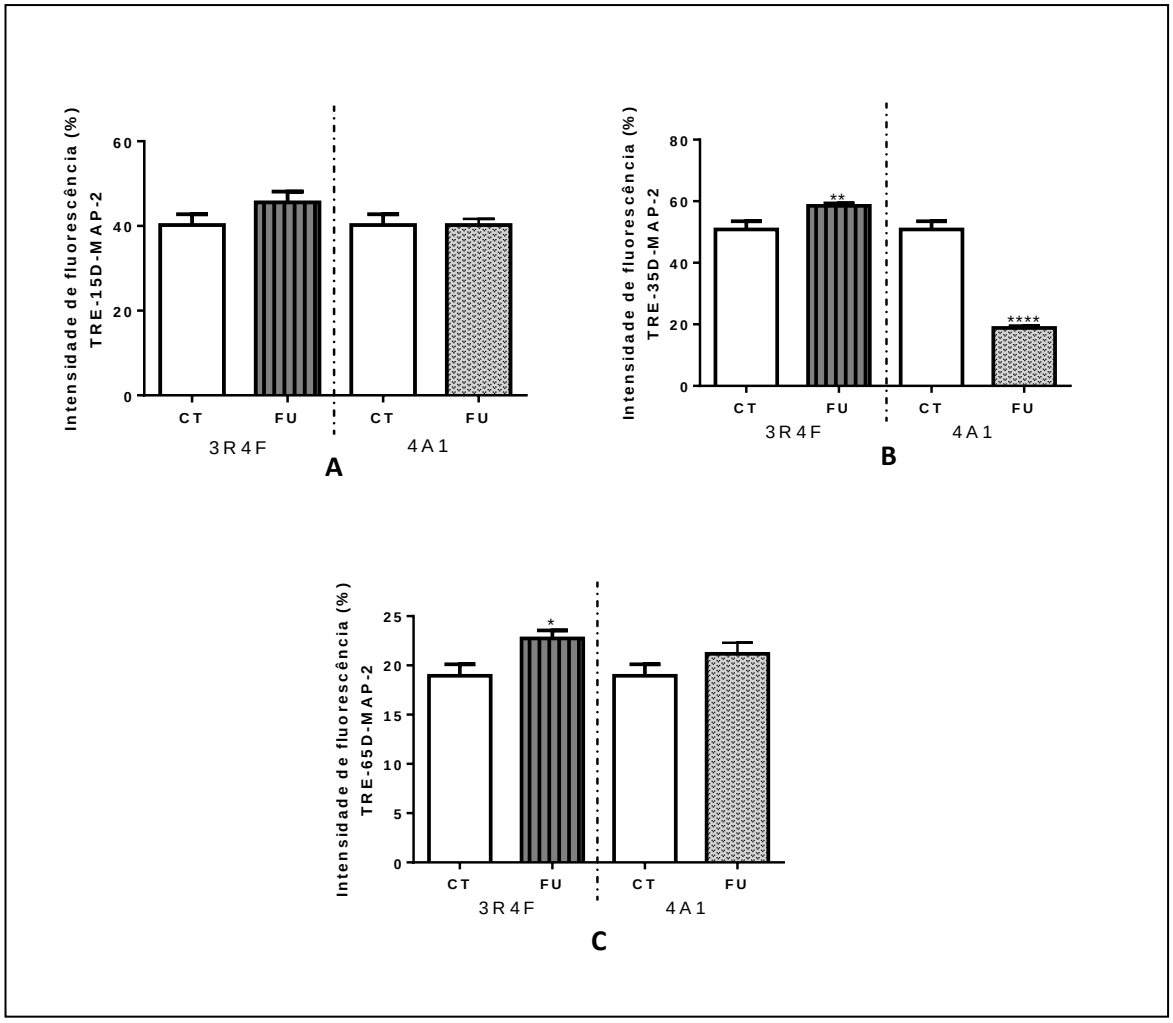


Figura 41: Análise quantitativa da proteína MAP-2 no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e do 4A1, nas idades de 15 (A), 35 (B) e 65 dias (C). Teste "*t*" de *Student, *p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p*<0,001. Dados expressos em intensidade de fluorescência em relação ao grupo controle (n=4). CT: Controle; FU: fumante.

Os resultados da análise quantitativa dos Neurofilamentos estão apresentados na figura 42. Como pode ser visto os dois cigarros diminuíram os neurofilamentos na adolescência (*p*<0,0001).

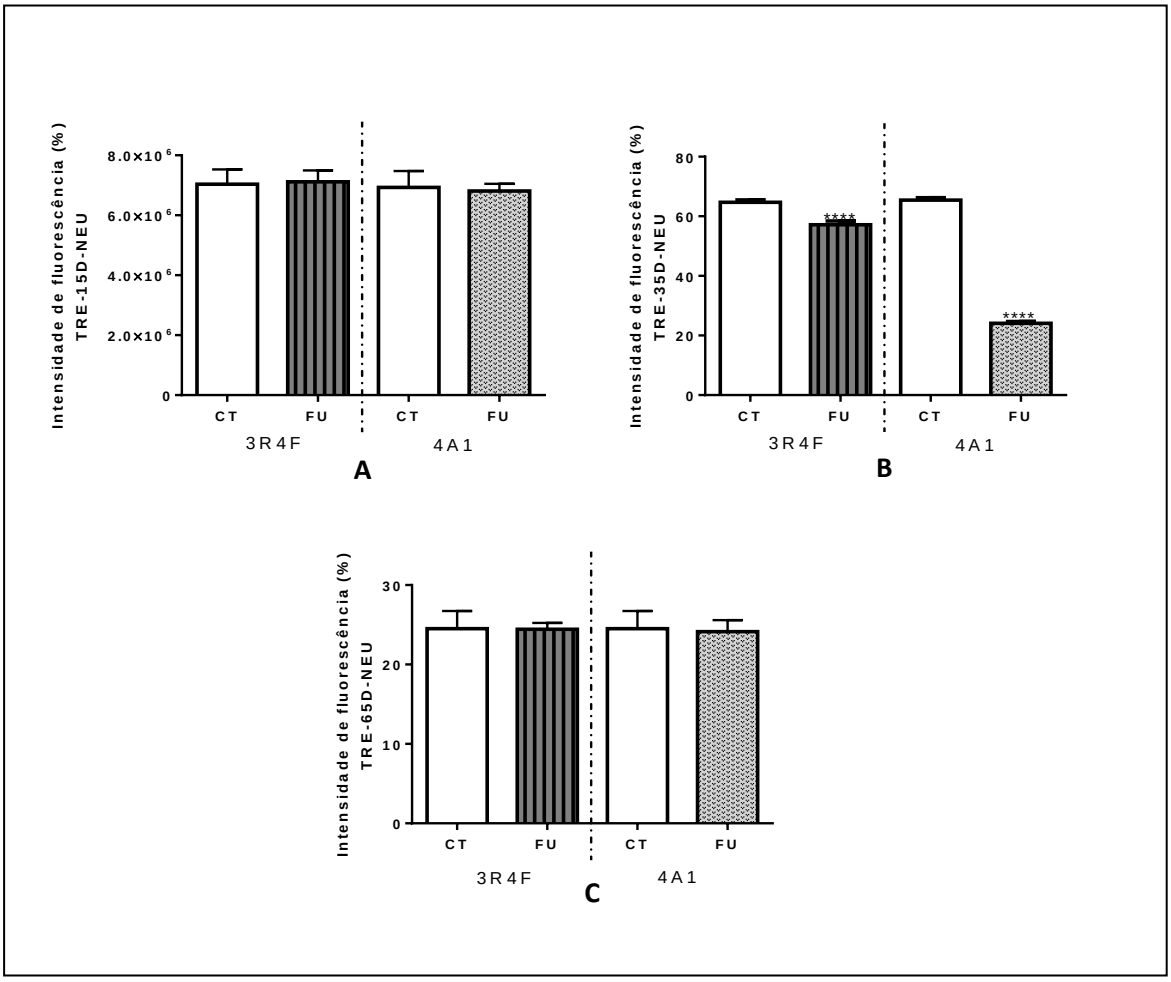


Figura 42: Análise quantitativa dos Neurofilamentos no tronco encefálico de animais expostos por 15 dias à fumaça do cigarro 3R4F e do 4A1, nas idades de 15 (A), 35 (B) e 65 dias (C). Teste "*t*" de *Student,* ****p<0,0001. Dados expressos em intensidade de fluorescência em relação ao grupo controle (n=4). CT: Controle, FU: Fumante.

Tabela 5: Resumo dos resultados obtidos nas análises de *Western Blotting*, PCR *Real time* e Imunofluorescência.

Proteínas	Cigarro	Cerebelo			Hipocampo			Tronco Encefálico		
		15D	35D	65D	15D	35D	65D	15D	35D	65D
SYN1	3R4F	⇩	⇩	-	⇧	⇩	-	-	⇧	⇩
	4A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SYT	3R4F	-	-	-	-	⇧	-	-	-	-
	4A1	-	-	-	-	-	-	-	-	⇩
SYP	3R4F	-	-	-	-	⇧	-	-	-	-
	4A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SYB	3R4F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4A1	-	⇩	⇩	-	-	-	-	⇧	⇧
PSD-95	3R4F	-	-	-	⇩	-	-	-	-	-
	4A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EGR-1	3R4F	⇩	⇩	⇧	-	⇩	-	-	-	⇧
	4A1	-	-	-	-	-	-	-	-	⇧
Egr-1	3R4F	-	⇩	⇧	⇩	⇩	-	-	-	⇧
	4A1	⇩	⇩	-	-	⇧	-	⇧	⇧	-
MAP-2	3R4F	⇩	⇩	⇧	⇧	⇧	-	-	⇧	⇧
	4A1	⇩	⇩	⇧	⇩	⇧	-	-	⇩	-
NEU	3R4F	⇩	⇩	-	⇩	⇧	⇧	-	⇩	-
	4A1	⇩	⇩	-	⇩	⇩	⇧	-	⇩	-

SYN1 - sinapsina; SYT – sinaptotagmina; SYP – sinaptofisina; SYB – sinaptobrevina; PSD-95 – *post synaptic density protein-95*; EGR-1 – *early growth receptor -1*; *Egr-1* – gene promotor de EGR-1; MAP-2 – *microtubule associated protein – 2*; NEU - neurofilamentos; as setas representam as diminuições e os aumentos em relação aos animais controle, os traços representam diferenças não significativas.

5. Discussão

A poluição tabagística ambiental é considerada um problema de saúde pública e a exposição em fases precoces do desenvolvimento pode trazer consequências para a saúde ao longo da vida (WÜNSCH FILHO *et al*, 2010).

A barreira encefálica não é totalmente impermeável aos xenobióticos, estes podem atingir o SNC dependendo de suas características químicas, como a lipossolubilidade (FERNANDES, 2004). A nicotina é um alcalóide que tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e exercer seus efeitos nos receptores colinérgicos nicotínicos, que estão localizados em todo o SNC (RODIER, 1995).

No SNC a nicotina tem um efeito farmacológico semelhante às drogas psicoativas como a cocaína e a anfetamina, interagindo na área tegumentar ventral e no núcleo accumbens, principais áreas relacionadas à recompensa e à dependência. Alguns estudos sugerem que a nicotina pode ainda aumentar a atividade locomotora, além de exercer um efeito reforçador no consumo de outras drogas (IÑIGUEZ *et al*, 2009).

Outros estudos indicam que a nicotina induz adaptações moleculares que podem modificar a ativação de fatores intracelulares e promover alterações na transcrição de proteínas, como por exemplo, nas transmissões glutamatérgicas, podendo aumentar o mRNA e/ou as concentrações proteicas dos receptores AMPA e NMDA (REZVANI *et al*, 2007).

Dajas-Bailador e Wonnacott (2004), em sua revisão, descreveram que um dos efeitos da nicotina está ligado à liberação dos neurotransmissores por meio da ativação dos receptores nicotínicos, e que ainda pode exercer alterações pós-sinápticas, contribuindo com a sua potenciação devido ao baixo estímulo pré-sináptico. Pela regulação na neurotransmisssão glutamatérgica a nicotina pode ainda induzir a potenciação de longa duração mediada pelo receptor NMDA, fenômeno que pode contribuir para a adaptação celular.

Durante o desenvolvimento do SNC os receptores colinérgicos nicotínicos estão envolvidos no desenvolvimento neural e de circuitos sensoriais, bem como na sobrevivência celular e na maturação das sinapses. A exposição à nicotina nesta fase é considerada um fator de risco para o surgimento de alterações

comportamentais e de déficit de memória, podendo ainda aumentar a ansiedade e promover efeitos depressivos, problemas estes que podem se estender da infância até a fase adulta. (WICKSTRÖM, 2007; DWYER, 2009; PARAMESHWARAN *et al*, 2012).

Villaça *et al.* (2010) compararam a exposição de dois cigarros com diferentes concentrações de nicotina, o 3R4F(0,73 mg de nicotina) e o 4A1 (0,16 mg de nicotina), em elementos da transmissão colinérgica, em animais expostos durante a adolescência (P 30-45). Foi observado que mesmo nas exposições aos cigarros de baixa concentração de nicotina, elementos da transmissão colinérgica, como a reciclagem da acetilcolina e o retorno da colina para a membrana pré-sináptica, foram alteradas; no cigarro 3R4F houve um aumento no retorno da colina no hipocampo e no córtex, e no cigarro 4A1, o retorno de colina aumentou somente no córtex.

Os cigarros 3R4F e 4A1 são cigarros referência produzidos pela Universidade de Kentucky, e possuem diferentes concentrações de nicotina. Esta diferença de concentração foi confirmada pelos resultados da monitorização biológica da exposição (quantificação de COHb).

A COHb, é considerada um biomarcador de intensidade de fumo que compara os fumantes de acordo com o quantidade de cigarros fumados (APPLETON et al, 2015). Nossos resultados de COHb mostram que não houve diferença entre os dois cigarros e que a exposição se deu da mesma forma para os animais expostos.

Os cigarros 3R4F e 4A1 são cigarros referência produzidos pela Universidade de Kentucky, sendo que uma das diferenças entre eles é a concentração de nicotina. Este dado foi confirmado pela monitorização biológica da exposição através da determinação de nicotina/cotinina, que podemos observar foi maior no cigarro com concentração mais alta de nicotina e menor no cigarro com baixa concentração.

Estudos anteriores de nosso grupo mostraram que a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal de animais Balb-c induziu estresse oxidativo em diferentes regiões encefálicas, além de levar à diminuição de proteínas envolvidas na transmissão sináptica, prejudicar processos de mielinização, de aprendizagem e memória (TORRES *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2015).

Aprendizado e memória são processos dependentes de plasticidade sináptica, que envolve a formação da vesícula sináptica, bem como o transporte desta, a liberação do neuromediador, o seu retorno e reciclagem. Ao longo deste ciclo as

proteínas que podemos destacar como essenciais são sinapsina, sinaptotagmina, sinaptofisina, sinaptobrevina (ARISI; NEDER; MOREIRA, 2001; LEE; LITTLETON, 2010; MAYFORD; SIEGELBAUM; KANDEL, 2012).

O cerebelo é uma região encefálica que apresenta a maior taxa de crescimento durante o desenvolvimento. As suas regiões mediais estão envolvidas no controle dos reflexos somáticos e autonômicos, além dos movimentos compostos como a locomoção. O hemisfério intermediário está relacionado com o controle dos movimentos voluntários e por fim, o hemisfério lateral participa de funções cognitivas mais complexas, como a linguagem (LENT, 2010).

No presente estudo, observamos que nos animais expostos ao cigarro 3R4F ocorreu redução da quantidade de sinapsina na infância e adolescência e que nos animais expostos ao cigarro 4A1 a redução se deu na proteína sinaptobrevina durante a adolescência e fase adulta.

A sinapsina mostra-se essencial no acoplamento das vesículas sinápticas ao citoesqueleto, estudos em ratos durante a gestação mostram que uma deficiência de folato e vitamina B12 pode interferir neste acoplamento da vesícula, sugerindo que esta deficiência pode atuar diretamente na síntese de sinapsina (POURIÉ *et al*, 2015). Considerando que a fumaça do cigarro 3R4F reduziu a quantidade dessa proteína na infância e na adolescência, e ainda que esta proteína sináptica atua na liberação da vesícula pré-sináptica, podemos sugerir que a exposição a este cigarro, no início da vida, possa causar danos durante a liberação vesicular.

A sinaptobrevina é uma proteína de membrana vesicular constituinte da família SNARE, ela aproxima e funde as membranas do terminal sináptico por meio de um complexo formado por sinaptobrevina-2, sintaxina-1A e SNAP-25 (complexo SNARE) (ARISI, NEDER; MOREIRA, 2001; ZHANG et al., 2013). Durante o desenvolvimento do cerebelo esta proteína está mais associada as sinapses gabaérgicas (MOHRMANN *et al*, 2010). Considerando que a sinaptobrevina é responsável por estas características, sugerimos que o 4A1 pode ter exercido um efeito danoso durante a transmissão sináptica do cerebelo.

Na mesma estrutura (cerebelo) não observamos nenhuma diferença significativa na quantificação da sinaptofisina e nem na quantificação da sinaptotagmina em nenhum dos cigarros.

Além das alterações nas proteínas pré-sinápticas, observamos ainda no cerebelo, redução do fator EGR-1 na infância e adolescência e aumento na fase

adulta (3R4F). Nossos resultados indicam que a redução dessa proteína na infância e adolescência pode ter ocorrido devido à diminuição da expressão do gene *Egr-1*, quantificado por PCR *Real time*. O gene *Egr-1* é amplamente expresso em várias regiões do SNC; no cerebelo ele está relacionado com o auxílio da plasticidade de interpretação do movimento (THIEL *et al*, 2010).

Sabendo que o *Egr-1* é um fator importante que pode atuar durante a interpretação e plasticidade dos movimentos no cerebelo, podemos sugerir que estes eventos podem estar alterados na adolescência e na fase adulta dos animais expostos ao 3R4F e que estas mudanças foram mais evidentes na primeira fase da vida dos animais expostos ao 4A1. Nossos resultados são parecidos aos encontrados por Koldamova *et al.* (2012), que observou por meio da quantificação por PCR *Real time*, a diminuição desse gene, e que estes resultados ainda possam estar ligados de alguma forma com as alterações encontradas em neurodegenerações, como na doença de Alzheimer.

O Alzheimer está associado a comprometimentos de memória sérios. Autores sugerem que o início da degeneração se dá através de alterações sutis da eficácia sináptica do hipocampo e que esta disfunção sináptica é causada por aglomerados de proteína β amilóide, também chamados de placas senis (SELKOE, 2002).

Os estudos de Xue *et al*. (2015) demonstraram que a nicotina pode ativar a via de expressão MAPK/ERK/EGR-1 por meio do receptor nicotínico da acetilcolina (nAChR) α7. Os autores também verificaram que a ativação do gene *Egr-1* pela nicotina é dependente da concentração e que a *up-regulation* deste pode aumentar a fosforilação de CyclinD1 (proto-oncogene regulador da mitose celular), o que contribui para a atenuação da neurotoxicidade provocada pela proteína β amiloide, principal constituinte das placas senis na doença de Alzheimer, as placas senis são estruturas extracelulares constituídas desta proteína. Na doença a clivagem da proteína amiloide ocorre de forma alterada, gerando a proteína β amiloide, que vai se acumulando e provocando lesões no córtex cerebral (DOMINGUEZ, HARTMANN, 2004).

De modo geral, a exposição à fumaça do cigarro, tanto 3R4F quanto 4A1, promoveu alterações significativas na expressão de *Egr-1*, sugerindo que mesmo em concentrações diferentes de nicotina ainda é possível observar mudanças em relação à transcrição gênica durante o desenvolvimento.

A família de proteínas associadas ao microtúbulo (MAPs) estruturais inclui a MAP-2, que pode ser considerada um marcador precoce e sensível aos danos neuronais causados por lesão traumática (HUH et al., 2003). A inibição aguda de qualquer MAP estrutural em neurônios pode acarretar em uma diminuição do crescimento neurítico, proporcionando a ideia de que a estabilização do microtúbulo seria crucial para a diferenciação neuronal durante o desenvolvimento encefálico (DELOULME *et al*, 2015).

Uma das funções dos neurofilamentos é manter a integridade do axônio, durante o crescimento radial e até podem auxiliar na velocidade de condução do estímulo em axônios amplamente mielinizados, podendo ser utilizado como marcador para doenças neurodegenerativas (REDONDO *et al*, 2015;JULIEN, 1999).

Com relação às proteínas MAP-2 e Neurofilamentos, tanto o cigarro 3R4F quanto o cigarro 4A1 promoveram a redução destas proteínas na infância e na adolescência e embora somente a MAP-2 tenha aumentado na fase adulta.

Estas alterações podem estar relacionadas com a exposição à fumaça do cigarro, pois sabemos que alterações relacionadas aos neurofilamentos podem ser associadas à manutenção da integridade neuronal, assim como a proteína MAP-2 e considerando este fato, os animais expostos tanto para o 3R4F quanto para o 4A1 podem apresentar problemas relacionados à sustentação neuronal em alguma parte desta estrutura encefálica.

Zha *et al*. (2016) constataram por meio de imunoreatividade que a proteína MAP-2 diminui durante o desenvolvimento, o que evidencia sua importância durante este processo. Estudos como o de Yum *et al* (2009) constataram que a diminuição de neurofilamentos, leva a uma menor condução do estímulo pelos neurônios mielinizados durante o desenvolvimento e que isto pode agravar um quadro de neuropatia.

O hipocampo é uma estrutura encefálica responsável por várias funções dentre elas podemos destacar a formação da memória e o aprendizado. Por auxiliar na formação das memórias de longo prazo, o hipocampo é capaz de processar informações e armazená-las por um longo tempo, e exposições a xenobióticos como a nicotina pode alterar a modulação deste processo (KENNEY, GOULD, 2008). Estas informações são armazenadas por meio de um processo chamado plasticidade. A plasticidade é a capacidade que o sistema nervoso possui de se adaptar as novas condições do ambiente (LENT, 2010).

Uma das mais importantes plasticidades sinápticas é a LTP. A LTP ou potenciação de longa duração tem sido apontada como um dos mais importantes fatores para que as sinapses ocorram de modo eficiente, pois ela é capaz de modular a liberação do neuromediador na fenda sináptica, alterar a conformação dos receptores pós-sinápticos e pode ainda influenciar na ativação de genes responsáveis, por exemplo, na síntese de proteínas importantes para a manutenção da vesícula pré-sináptica como a sinapsina (TAKEUCHI; MORRIS; DUSZKIEWICZ, 2014).

Nas investigações realizadas no hipocampo, constatamos que a exposição ao cigarro 3R4F, aumentou a sinapsina na infância e diminuiu na adolescência, além disso, aumentou sinaptotagmina e sinaptofisina na adolescência, sugerindo que estes animais de alguma maneira tiveram as funções destas proteínas alteradas, e que estas alterações foram revertidas quando analisamos os animais na fase adulta. Em relação às investigações do cigarro de menor concentração o 4A1, não observamos diferenças significativas nas quantificações de nenhum dos elementos pré-sinápticos.

Estudos realizados com camundongos *knockout* para sinapsina demonstraram déficit de aprendizado e de memória, mostrando que a sinapsina é essencial para manutenção do número de vesículas sinápticas, por acelerar o transporte de vesículas perante uma estimulação repetitiva e regulação da plasticidade sináptica em curto prazo (SÜDHOF, 2004; Li L. *et al*., 1995).

A sinaptotagmina está ligada ao ancoramento e liberação de neurotransmissores (MARQUÈZE *et al*., 2000). Pang *et al.* (2006) mostraram que camundongos *knockout* C57-Bl que não expressam sinaptotagmina-2 possuem deficiências nas transmissões sinápticas, através de estudos que avaliaram a capacidade de se alimentar, observaram que a partir da segunda semana de vida estes animais pararam de procurar alimento e de crescer, levando a morte na terceira semana de vida, o que evidencia a importância das sinaptotagminas na liberação dos neurotransmissores, principalmente nas transmissões que envolvem a procura por alimento.

Nishiki *et al*., (2004) observaram por eletrofisiologia, que a sinaptotagmina no hipocampo pode estar associada com a sincronização e liberação de neurotransmissores, como o glutamato e o GABA, em resposta a potenciais de ação pré-sinápticos ao invés de controlar a quantidade de neuromediador que é liberado.

A sinaptofisina foi a primeira proteína da membrana de vesícula sináptica, clonada e isolada (VALTORTA *et al.*, 2004); esta proteína desempenha importante papel na biogênese, formação sináptica, exo e endocitose dessas vesículas e portanto, essencial na liberação de neurotransmissores (FERREIRA *et al* 2006). Chapman (2011) constatou que em animais knock-out para sinaptofisina a endocitose da vesícula pré-sináptica é mais lenta e menos eficiente. A perda de desta proteína pode levar a um "engarrafamento' de componentes vesiculares em locais de libertação da vesícula e, assim, contribuir para depressão sináptica durante a transmissão.

Quando analisamos o elemento pós-sináptico (PSD-95) constatamos que somente na infância dos animais expostos ao 3R4F ocorreu diminuição, sugerindo que a manutenção da membrana pós-sináptica possa estar alterada de alguma forma, pois a PSD-95 é necessária para que ocorra a maturação e a plasticidade das transmissões, Ehrlich *et al.* (2007) mostraram que camundongos *knockdown* para PSD-95,durante a infância, apresentaram deficiências na execução das sinapses glutamatérgicas devido a ausência desta proteína.

Em relação às proteínas MAP-2 e neurofilamentos, observamos que durante a infância ocorreu o aumento de MAP-2 no 3R4F e redução no 4A1, a redução é também observada quando analisamos os neurofilamentos em ambos os cigarros, nesta mesma idade. Na adolescência somente os neurofilamentos do 4A1 se mantiveram reduzidos, pois MAP-2 aumentou para ambos os cigarros. Na fase adulta somente os neurofilamentos aumentaram para ambos os cigarros.

Levando em consideração as características destas duas proteínas quanto à manutenção da integridade do neurônio, podemos sugerir que o aumento e a diminuição pode ter ocorrido devido à exposição à fumaça do cigarro, já que durante o desenvolvimento estas estruturas estão relacionadas não só a integridade como também ao transporte de vesículas para a membrana sináptica (LARSEN; HOLZBAUR, 2002).

Sabe-se que o tronco encefálico atua em conjunto com a medula espinhal para controlar as funções vitais, como na regulação da frequência cardíaca, da pressão sanguínea e na respiração. A exposição à fumaça do cigarro tem sido apontada como um dos fatores de risco para a síndrome da morte súbita infantil, nesta síndrome a criança tem um comprometimento cardiorrespiratório que a leva a morte, logo o tronco encefálico devido as suas funções tem sido apontado como a

principal estrutura relacionada com este fenômeno (JONES *et al*.,2008; MAUAD, 2010).

Com relação ao tronco encefálico, houve efeitos tardios da exposição à fumaça do cigarro, demonstrado pelo aumento na concentração de sinapsina na adolescência e na fase adulta. Este resultado é particularmente relevante, pois a sinapsina está ligada a manutenção das vesículas, estando estas funções comprometidas às sinapses podem ocorrer de forma inadequada levando a um comprometimento das próprias funções do tronco encefálico, como a manutenção do sistema cardiorrespiratório, e o fumo passivo é um dos fatores de risco para que ocorra a síndrome da morte súbita infantil. O mecanismo fisiopatológico dessa síndrome ainda não é conhecido, e provavelmente envolve o desenvolvimento desta estrutura.

Observamos que os elementos pré-sinápticos (sinaptotagmina e sinaptobrevina) não mostraram alterações significativamente diferentes, quando os animais foram expostos à fumaça do cigarro 3R4F, porém nos animais expostos ao 4A1 a sinaptotagmina mostrou-se diminuída na fase adulta e a sinaptobrevina diminuiu durante a adolescência sendo este comportamento observado também durante a fase adulta, podemos sugerir que este aumento possa estar relacionado a alguma mudança na conformação desta vesícula sináptica.

Na mesma estrutura, nossos resultados indicam que a exposição à fumaça do cigarro 3R4F induz aumento da expressão gênica de *Erg-1* na fase adulta e aumento na concentração proteica de ERG-1 também na fase adulta, e nos animais expostos ao 4A1 observamos que as alterações da expressão de *Egr-1* começaram na infância e se estenderam até a adolescência sendo possível perceber ainda uma alteração na quantificação da proteína EGR-1 na fase adulta.

Em conjunto, estes resultados sugerem que a exposição à fumaça no início do período pós-natal é capaz de induzir alterações na modulação da função da EGR-1 mesmo à longo prazo. No caso dos animais expostos ao 3R4F o aumento da expressão gênica de *Egr-1* na fase adulta pode indicar um mecanismo de adaptação frente à exposição ao xenobiótico, já que neste caso as mudanças se deram de forma tardia, em relação aos animais expostos ao 4A1 estas mudanças se deram de forma precoce, sugerindo que a expressão gênica do *Egr-1* possa estar alterada, uma vez que pesquisadores como Xue *et al*. (2015) investigaram que a nicotina pode ser capaz de modular a expressão de *Egr-1*.

Quando quantificamos as proteínas MAP-2 e os neurofilamentos constatamos que durante a adolescência ocorreu um aumento de MAP-2 nos animais expostos ao 3R4F, visto que na mesma idade os animais expostos ao 4A1 tiveram uma diminuição em relação a esta proteína. Os neurofilamentos mostraram-se diminuídos em ambos os cigarros durante a adolescência. Estas modificações sugerem que o tronco encefálico pode ter tido alterações em relação à sustentação neuronal (LARSEN; HOLZBAUR, 2002).

As alterações observadas foram pontuais e mais evidentes no cerebelo, provavelmente pelas características desta estrutura, que se desenvolve até a adolescência. No hipocampo as alterações foram mais evidentes durante a infância, pois esta é uma estrutura que apresenta uma taxa de desenvolvimento alta somente durante este período, podendo ser susceptível a alterações devido a exposições a agentes externos, como a fumaça do cigarro. Em relação ao tronco encefálico esta é uma estrutura que apresenta várias junções dos sistemas de transmissão e pode ser esta a razão das alterações só serem perceptíveis a partir da adolescência.

6 Conclusões

Os primeiros dias de vida de um indivíduo são caraterizados como críticos para o desenvolvimento normal do SNC, pois exposições a xenobióticos, como a PTA, podem promover alterações durante este desenvolvimento.

Nossos resultados mostraram que a exposição à fumaça de cigarro, mesmo com diferentes concentrações de nicotina, alteram elementos importantes para a transmissão sináptica como as proteínas vesiculares, bem como o fator de transcrição e até mesmo a expressão gênica deste fator em diferentes áreas encefálicas.

Assim concluímos que a exposição a PTA no início do período pós-natal, mesmo em baixas concentrações de nicotina, altera elementos envolvidos na transmissão sináptica em diferentes regiões encefálicas durante diferentes fases de desenvolvimento.

7 Referências Bibliográficas

ADAMS, D. J. Architecture of the Synaptophysin/ Synaptobrevin Complex: Structural Evidence for an Entropic Clustering Function at the Synapse.**Scientific Reports** v.5, p. 1 - 9 , 2015 DOI: 10.1038/srep13659

ALTMAN, J.; BAYER, S. A. Migration and Distribution of Two Populations of Hippocampal Granule Cell Precursors During the Perinatal and Postnatal Periods. **The journal of comparatlve neurology**. nº301, p. 365-381. 1990.

ARISI; NEDER; MOREIRA J. E. *et al.*.O ciclo da vesícula sináptica: panorama molecular.**Revista de Medicina**, Ribeirão Preto,v. 34, p.154-169 , 2001.

APPLETON S, LIU J, LIPOWICZ PJ, SARKAR M. Effect of cigarette design on biomarkers of exposure, puffing topography and respiratory parameters. **Inhalation Toxicology**. v.27, p.174-180, 2015.

ASOMANING, K. et al. Second hand smoke, age of exposure and lung cancer risk. **Lung cancer**, v.61, n.1, p.13-20, 2008.

AZOGUI, A., M. KORNREICH, *et al*. "Neurofilament assembly and function during neuronal development. **Current Opinion in Cell Biology.** v. 32 p. 92-101, 2015.

BACCI, A *et al.*Chronic blockade of glutamate receptors enhances presynaptic release and downregulates the interaction between synaptophysin-synaptobrevin-vesicle-associated membrane protein 2.**The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 17, p. 6588–6596, 2001.

BALBANI A. P. S. *et al*. Methods for smoking cessation and treatment of nicotine dependence.**Rev Bras Otorrinolaringol***,*v.71, n.6, p.820-6, 2005.

BARTON, H. A. *et al*. Assessing Susceptibility from Early-Life Exposure to Carcinogens. **Environmental Health Perspectives**, v.113, n.9, p.1125-1133, 2005.

BATISTA, R. S., *et al*.O Sistema Nervoso Autônomo.Revista Moreira Jr.p.206 – 212, 2004.

BECHER, A *et al.*. The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation.**The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 6, p. 1922–1931, 1999.

BENFENATI, F. *et al.*. Electrostatic and hydrophobic interactions of synapsin I and synapsin I fragments with phospholipid bilayers.**The Journal of cell biology**, v. 108, n. 5, p. 1851–1862, 1989.

BENNETT, D. S. *et al.*. Prenatal tobacco exposure predicts differential brain function during working memory in early adolescence: a preliminary investigation. **Brain imaging and behavior**, v. 7, n. 1, p. 49–59, 2013.

BENOWITZ NL, HUKKANEN J, JACOB P. Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. **Handbook of experimental pharmacology**. v. 192, p. 29-60, 2009.

BERTON F. *et al*.Developmental Regulation of Synaptotagmin I, II, III, and IV mRNAs in the Rat CNS. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n.4, p.1206–1216, 1997.

BOFFETTA, P.*et al*. Risk of childhood cancer and adult lung cancer after childhood exposure to passive smoke: A meta-analysis. **Environmental Health LASER- Perspectives**, v.108, n.1, p.73-82, 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal Biochem**,v.72, p.248, 1979.

BROWN, R. W., KOLB B. Nicotine sensitization increases dendritic length and spine density in the nucleus accumbens and cingulate cortex. **Brain Research**. v. 899,p.94-100,2001.

BYRD GD *et al*. A further study of FTC yield and nicotine absorption in smokers. **Psychopharmacology**. v.139, p. 291–299, 1998.

CASTILHO, A. P., *et al*.The transcription factor early growth response factor-1 (EGR-1) promotesapoptosis of neuroblastoma cells.**Biochem. J.** v.373, p. 739–746, 2003.

CHAPMAN, E. R.*et al*.Synaptophysin Regulates the Kineticsof Synaptic Vesicle Endocytosis in Central Neurons.**Neuron Report**v. 70, p. 847–854, 2011.

CHEN X. *et al.* Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules.**PNAS** , v. 102, n. 32 , p. 11551–11556, 2005.

COUTO, M. B. S.; CAMPELO, V. R. C. **A ANVISA NA REDUÇÃO À EXPOSIÇÃO INVOLUNTÁRIA À FUMAÇA DO TABACO**. Gerência de Produtos Derivados do Tabaco – GPDTA / ANVISA. ANVISA. 2009. 24p.

DAJAS-BAILADOR F, WONNACOTT S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. **Trends Pharmacol Sci**, v.25, p. 317–324,2004.

DEÁK, F. et al. Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis.**NATURE CELL BIOLOGY.**v .6 , n. 11 p. 1102-1108 nov. 2004.

DELOULME J-C, GORY-FAURÉ S, MAUCONDUIT F, ET AL. Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. **Nature Communications** .v.6, p.1-16, 2015.

DOMINGUEZ, D.I., HARTMANN, D., DE, S.B. BACE1 and presenilin: two unusual aspartyl proteases involved in Alzheimer's disease. **Neurodegener. Dis**. v.1, p.168–174, 2004.

DOSEMEC, A. et al.Composition of the Synaptic PSD-95 Complex.**Molecular & Cellular Proteomics** v.6,n.10,p.1750-1760, 2007.

DUNSBY, J. A nicotine delivery device without the nicotine? Tobacco industry development of low nicotine cigarettes. **Tobacco Control**,v.13, p 362–369, 2004. doi: 10.1136/tc.2004.007914

DWYER, J. B.*et al*. Nicotine and brain development. Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews, v. 84, n. 1, p. 30–44, 2008.

DWYER, J. B.*et al*.. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. **Pharmacology & therapeutics**, v. 122, n. 2, p. 125–139, 2009.

EHRLICH ,I.*et al*. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization**.PNAS** v. 104 n. 10, p 4176-4181, 2007.

EL-HUSSEINI A., *et al.* .PSD-95 Involvement in Maturation of Excitatory Synapses.Science, v 290, n. 5495, p. 1364-1368,2000.

FERNANDES C.L. **Desenvolvimento neuropsicomotor em crianças entre 0 e 12 meses de idade residentes nas comunidades próximas ao parque industrial do município do rio grande/RS.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem da Fundação Universidade Federal do Rio Grande/RS 2004.

FERNÁNDEZ E, COLLINS MO, UREN RT. Targeted tandem affinity purification of PSD-95 recovers core postsynaptic complexes and schizophrenia susceptibility proteins. **Molecular Systems Biology.**v.5, p. 1-17,2009.

FERREIRA, L. T. Sinais de tráfego envolvidos no endereçamento do Transportador Vesicular de Acetilcolina (VAChT) Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

FLETCHER T. L. *et al*. The Distribution of Synapsin I and Synaptophysin in Hippocampal Neurons Developing in Culture. **The Journal of Neuroscience**, v. 1, n.6, p. 1617-l 626, 1991.

GALAS L.; BÉNARD M.; LEBON A.; KOMURO Y.; SCHAPMAN D.; VAUDRY H.; VAUDRY D.; KOMURO H. Postnatal Migration of Cerebellar Interneurons. **Brain Science**. n º7, v. 62, p. 1-18. 2017.

GALÃO, A. O.,*et al.*. Efeitos do fumo materno durante a gestação e complicações perinatais.**Revista HCPA**, v. 29, n.3, p.218-224,2009.

GARNER, C. C *et al.* Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis.**TRENDS in Neurosciences** v.25 n.5 , 2002.

HANNAH, M.J. *et al.* Synaptic vesicle biogenesis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol***.v.* 15,p. 733–798,1999.

HUH, J. W. *et al.*. Transient loss of microtubule-associated protein 2 immunoreactivity after moderate brain injury in mice. **Journal of neurotrauma**, v. 20, n. 10, p. 975-84, 2003.

HUKKANEN J, JACOB P, BENOWITZ N. L. Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine .**Pharmacological Reviews**. v.57, p. 79-115,2005.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Política Nacional de Controle do Tabaco.Relatório de gestão e progresso pg:12. 2014.

IÑIGUEZ, S. D *et al*. Nicotine Exposure during Adolescence Induces a Depression-Like State in Adulthood. **Neuropsychopharmacology** v.34, p. 1609–1624,2009.

JONES L.G. *et al*. Lead Exposure During Development Results in Increased Neurofilament Phosphorylation, Neuritic Beading, and Temporal Processing Deficits Within the Murine Auditory Brainstem.**The Journal of comparative neurology,** v. 506, p. 1003–1017, 2008.

JOHNSON, G. V. W. , JOPE, R. S. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. **J. Neurosci. Res**. v. 33, p. 505–512, 1992.

JULIEN, J.-P. "Neurofilament functions in health and disease." **Current Opinion in Neurobiology. v. 9, p.** 554-560,1999.

KENNEY JW, GOULD TJ. Modulation of Hippocampus-Dependent Learning and Synaptic Plasticity by Nicotine. **Molecular neurobiology**.v.38,p.101-121,2008.

KIM, M. J, *et al*. Synaptic Accumulation of PSD-95 and Synaptic Function Regulated by Phosphorylation of Serine-295 of PSD-95**. Neuron.** v**.** *56* , *p. 488-502, 2007.*

KOLDAMOVA R. *et al*. Genome-wide approaches reveal EGR1-controlled regulatory networks associated with neurodegeneration. **Neurobiology of Disease**, v.63, p.107-114,2014.

KWON, S. E.*et al.* Synaptophysin Regulates the Kinetics of Synaptic Vesicle Endocytosis in Central Neurons. ***Neuron***. v.*70, n.*5, p. 847–854, 2011.

LANGONE JJ, GJIKA HB, VAN VUNAKIS H. Nicotine and its metabolites. Radioimmunoassays for nicotine and cotinine. **Biochemistry**. v. 24, p. 5025-30,1973.

LARSEN, E.C.E; HOLZBAUR L.F. Axonal transport and neurodegenerative disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.** v. 1762, nº 11–12**,** p**.** 1094-1108**.** 2006**.**

LEE; LITTLETON, J. T..Complexin and Synaptotagmin in Synaptic Function and Plasticity.**Biophysical Journal**.v 98, n 3, suplemento1, Jan 2010, Pg 679a.

LEOPERCIO, W. *et al*.. Tabagismo e suas peculiaridades durante a gestação: uma revisão crítica.**Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 2, p. 176-185, 2004.

LENT R. Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais de neurociência, Ed.2.Editora Atheneu, São Paulo, 2010.

LEWIS DF, DICKINS M, LAKE BG, EDDERSHAW PJ, TARBIT MH, GOLDFARB PS. Molecular modelling of the human cytochrome P450 isoform CYP2A6 and investigations of CYP2A substrate selectivity. **Toxicology**. v.133, p.1–33,1999.

LI, L. *et al*. Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice.**PNAS**. v.92, p. 9235-9239,1995.

MANSVELDER H. D. *et al*. Cellular and Synaptic Mechanisms of Nicotine Addiction.**Wiley Periodicals, Inc.**, p. 606-617, 2002.

MARQUÈZE B. *et al*. Synaptotagmins in membrane traffic: Which vesicles do the tagmins tag?.**Biochimie**, v. 82, p. 409−420, 2000.

MAUAD, H.. Aula sobre tronco cerebral no controleda função motora.Neurofisiologia UFES.Maio,2010.

MAYFORD M, SIEGELBAUM SA, KANDEL ER. Synapses and Memory Storage. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.** v. 4, p. 1-18, 2012.

MCCAFFREY, T. A., *et al.*. High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p.653-662, 2000.

MERLO S, *et al*., et al. O ciclo da vesícula sináptica, espinhos dendríticos e a transdução de sinal.**Medicina (Ribeirão Preto)**v.44, n.2,p.157-71, 2011.

MIALE, I.L.; SIDMAN, R.L. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. **Experimental Neurology.** nº 4, p. 277–296, 1961.

MISHRA A, *et al*. Harmful effects of nicotine. **Indian J Med Paediatr Oncol**. v. 36, p. 24-31,2015.

MOHRMANN R. *et al*. B. Fast vesicle fusion in living cells requires at least three SNARE complexes. **Science.** v. 330, p. 502–505, 2010.

MOORE, K. L., *et al*. **The developing human: clinically oriented embryology.**Developing Human: Clinically Oriented Embryology . Ed 8. Editora Saunders, 2003.

NAKAUCHI S, MALVAEZ M, SU H, SU H , KLEEMAN E , DANG R , WOOD M.A. , KATUMI S. Early postnatal nicotine exposure causes hippocampus-dependent memory impairments in adolescent mice: association with altered nicotinic cholinergic modulation of LTP, but not impaired LTP. **Neurobiology of learning and memory**. v. 0, p. 178-188, 2015.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=89594, http//pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/89594 (Acesso em 12/02/2017).

NISHIKI T. *et al*. Synaptotagmin I Synchronizes Transmitter Release in Mouse Hippocampal Neurons.**The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 27, p. 6127– 6132, 2004.

OGA S. Fundamentos de Toxicologia. Ed. 3., p. 422-431.**Editora Atheneu**, São Paulo, 2008.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, Dia mundial sem tabaco: a interferência da indústria do tabaco, 2012. Acesso em: 20 de maio de 2014

ORR M. E.; GARBARINO V.R.; SALINAS, A.; BUFFENSTEIN, R. Extended Postnatal Brain Development in the Lonest Lived Rodent: Prolonged Maintenance of Neotenous Traits in the Naked Mole-Rat Brain. **Frontiers in Neuroscience**. v.10, nº 504. 2016.

PANG, Z. P. *et al*. Synaptotagmin-2 Is Essential for Survival and Contributes to Ca^{++} Triggering of Neurotransmitter Release in Central and Neuromuscular Synapses.**The Journal of Neuroscience**, v. 26, n.52,p.13493–13504 , 2006.

PANKOW, J. F., TAVAKOLI A. D. , LUO W, ISABELLE L. M. Percent Free Base Nicotine in the Tobacco Smoke Particulate Matter of Selected Commercial and Reference Cigarettes. **Chem. Res. Toxicol**. v. 16 , p. 1014–1018, 2003

PARAMESHWARAN, K. *et al*. Developmental nicotine exposure induced alterations in behavior and glutamate receptor function in hippocampus. **Cell. Mol. Life Sci**. V. 69, p. 829–841,2012.

PAWLIZAK, **S . Neurons and Neuronal Growth, 2009. Disponível em: http://home.unileipzig.de/pwm/web/?section=introduction&page=neurons. Acesso em: 22/09/2015.**

PFAFFL M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**.v. 29, p.2002-2007, 2001.

PIERIBONE, V. *et al.*. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release.**Nature**, v. 375, n. 6531, p. 493–497, 1995.

PRANGE O., MURPHY T. H. Modular Transport of Postsynaptic Density-95 Clusters and Association with Stable Spine Precursors during Early Development of Cortical Neurons. **Journal of Neuroscience**. v.21, p. 9325-9333, 2001.

POURIÉ G. Folate and vitamin B12–deficient diet during gestation and lactation alters cerebellar synapsin expression via impaired influence of estrogen nuclear receptor α. **The FASEB Journal.**v.29, p 1-13, 2015.

RABINOFF M, CASKEY N, RISSLING A, PARK C. Pharmacological and Chemical Effects of Cigarette Additives. **American Journal of Public Health.**.v. 97,p. 1981-1991, 2007.

REDONDO, J *et al*. Purkinje Cell Pathology and Loss in Multiple Sclerosis Cerebellum. **Brain Pathology**, v.25, p.692–700,2015.

REICHERT, J., *et al.* Diretrizes para cessação do tabagismo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v .10, n.34, p.845-880, 2008.

REZVANI, K. *et al*. Nicotine Regulates Multiple Synaptic Proteins by Inhibiting Proteasomal Activity. **The Journal of Neuroscience**. V. 39, p. 10508 –10519,2007.

RICE, DEBORAH; BARONE, STAN JR. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. **Environmental Health Perspectives.** 2000; 108(3): 511-533.

RODIER P. M. Developing Brain as a Target of Toxicity. **Environmental Health Perspectives**,v. 103, n. 6, p.73-76, 1995.

ROSEMBERG, J. **Nicotina:** droga universal. Monografia. Produção Independente. São Paulo: 2004.

SCANNEVIN, R.H.*et al*.. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. **Nat. Rev. Neurosci.** v.1,p.133–141,2000.

SCHEIFFELE, P. Cell-cell signaling during synapse formation in the cns**Annu. Rev. Neurosci**, v.26,p.485–508, 2003.

SELKOE, D.J. Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. **Science** v. 298, n° 5594, p. 789-791. 2002.

SEMPLE, B. D. *et al*. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Prog Neurobiol**, p.1-16, 2013.

SHENG, M. Molecular organization of the postsynaptic specialization. **Proc. Natl. Acad. Sci.U. S. A.** *v.*98, p.7058–7061,2001.

SHENG M. *et al*.The Postsynaptic Organization of Synapses.**Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.3, p. 1-20, 2011.

SHIGENAGA MK, TREVOR AJ, CASTAGNOLI N., JR Metabolism-dependent covalent binding of (S)-[5–3H] nicotine to liver and lung microsomal macromolecules. **Drug Metab Dispos**.. v. 3, p. 397–402,1988.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH. Fundamentos de Química Analítica. 8ª Edição, **Editora Thomson**, São Paulo-SP, 2006.

SLEPNEV, V.I. *et al*. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. **Nat. Rev. Neurosci**, v.3, p. 161–172, 2001.

SLOTKIN, T. *et al.*. Effects of Prenatal Nicotine Exposure on Biochemical Development of Rat Brain Regions : Maternal Drug Infusions via Osmotic Minipumps achieved, p. 602–611, 1987.

SLOTKIN, T. A. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. **Toxicology and applied pharmacology**,v.198, n.2, p. 132–151, 2004.

SMITH, L. N., C. G. MCDONALD, BERGSTROM HC, BRIELMAIER JM, EPPOLITO AK, WHEELER TL, FALCO AM, SMITH RF. Long-term changes in fear conditioning and anxiety-like behavior following nicotine exposure in adult versus adolescent rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.**v. 85**,** p. 91-97, 2006.

ST.CHARLES FK, KRAUTTER GR, DIXON M, MARINER DC. A comparison of nicotine dose estimates in smokers between filter analysis, salivary cotinine, and urinary excretion of nicotine metabolites. **Psychopharmacology**.v. 189 p. 345-354, 2006.

SÜDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle. **Annual review of neuroscience**, v. 27, p. 509–547, jan. 2004.

TAFT CE, TURRIGIANO GG. PSD-95 promotes the stabilization of young synaptic contacts. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 369, p. 1-8, 2014.

TAKEUCHI T, DUSZKIEWICZ AJ, MORRIS RGM. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 369, p. 1-14, 2014.

THIEL G., *et al.*. Regulation of Synapsin I Gene Expression by Zinc Finger Transcription Factor zif268/erg-1.**The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n21, p 15294-15301, 1994.

THIEL G. *et al*. Egr-1—A Ca2+-regulated transcription factor. **Cell Calcium**,v. 47, p. 397–403, 2010.

TORRES, L.H.L. **Efeitos da inalação da fumaça do cigarro no estresse oxidativo do sistema nervoso central de camundongos jovens.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TORRES, L. H. L. *et al.*. Environmental tobacco smoke induces oxidative stress in distinct brain regions of infant mice. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, v. 75, n. 16-17, p. 971-80, 2012.

TORRES, L. H. L. *et al.*. Environmental tobacco smoke in early postnatal period induces impairment in brain myelination**. Arch Toxicol.** Organ Toxicity and Mechanisms. V. 89, p. 2051–2058, 2014.

TORRES LH, *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**. v.10, 2015.

TUTKA, P. *et al*. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine.**Pharmacological Reports**. , v.57, p143-153, 2005.

USDHHS. **Risks associated with smoking cigarettes with low machine-measured yields of tar and nicotine.** Smoking and Tobacco Control Monographs, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Cancer Institute; 2001.

VALAVANIDIS, A.*et al*. Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.6, n.2, p.445-462, 2009.

VALTORTA, F. *et al.*. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? p. 445–453, 2004.

VERHAGE, M *et al.* Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. **Science** *v.* 287, p. 864–869, 2000.

VILLAÇA, Y. A. *et al.*Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: Differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus.**Nicotine & Tobacco Research,** v. 12, n. 7, p. 776–780, 2010.

XUE M. *et al*. Low Dose Nicotine Attenuates Aβ Neurotoxicity through Activation Early Growth Response Gene 1 Pathway. **PLOS ONE**,p 1-13,2015.

WAITES, C. L.; CRAIG, A. M.; GARNER, C. C. MECHANISMS OF VERTEBRATE SYNAPTOGENESIS. **Annual Review of Neuroscience**, v.28, n.1, p.251-274, 2005.

WANG J. *et al*. Strain- and region-specific gene expression profiles in mouse brain in response to chronic nicotine treatment. **Genes, Brain and Behavior**, v. 7, p. 78–87, 2008.

WERTZ M. S., KYRISS T, PARANJAPE S, GLANTZ S. A.The Toxic Effects of Cigarette Additives. Philip Morris' Project Mix Reconsidered: An Analysis of Documents Released through Litigation. **Plos One**.v. 8, p. 1-15, 2011.

WICKSTRÖM R. Effects of Nicotine During Pregnancy: Human and Experimental Evidence. **Current Neuropharmacology**.v. 5, p. 213-222,2007.

WÜNSCH FILHO, V. *et al*,Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas.**RevistaBrasileiraEpidemiologia**,v.13, n.2, p. 175-87, 2010.

YACHNIS, A. T.; RORKE, L. B. Cerebellar and Brainstem Development: An Overview in Relation to Joubert Syndrome. **Journal of Child Neurology.** v 14, nº 9, pp. 570 – 573. 2016.

YUM, S. W., et al. A novel recessive *Nefl* mutation causes a severe, early-onset axonal neuropathy. **Ann Neurol**. v.66, p. 759–770,2009.

ZHA G, SHEN M, GU X, YI S. Changes in microtubule-associated protein tau during peripheral nerve injury and regeneration. **Neural Regeneration Research**.v.11, p. 1506-1511,2016.

ZHAI, R.G. *et al*. Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active zone precursor vesicle. **Neuron** *, v.* 29, p. 131–143, 2001.

ZHANG YQ, *et al*. Identification of CSPalpha clients reveals a role in dynamin 1 regulation. **Neuron**. v.74, p. 136–150, 2013.

Anexos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF **101.2014-P479**

C E R T I F I C A D O

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Efeitos da exposição à fumaça do cigarro na plasticidade sináptica no início do período pós-natal de camundongos**" (Protocolo CEUA/FCF/479), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Stephanie de Oliveira Duro**, sob orientação do(a) **Tania Marcourakis**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de **10 de outubro de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 15 de outubro de 2014.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: (11) 3091 3622 - e-mail: ceuafcf@usp.br

19/12/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 7308513/1 - Stephanie de Oliveira Duro

Email:	stephanieoliveira@usp.br
Data de Nascimento:	22/04/1987
Cédula de Identidade:	RG - 47.716.028-1 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Biomedicina - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - São Paulo - Brasil - 2010
Graduação:	Bacharela em Farmácia - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - São Paulo - Brasil - 2013

Curso:	Mestrado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	01/07/2014
Início da Contagem de Prazo:	01/07/2014
Data Limite para o Depósito:	01/05/2017
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Tania Marcourakis - 01/07/2014 até o presente. Email: tmarcour@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). Larissa Helena Lôbo Tôrres Pacheco - 10/09/2014 até o presente. Email: laristorres@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 01/07/2014
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 01/01/2017 até 01/05/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Reprovado em 14/08/2015 / Aprovado em 30/11/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 01/07/2014 Prorrogação em 25/10/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Prorrogação em 25/10/2016
Impresso em: 19/12/2016 15:37:42

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

19/12/2016

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 7308513/1 - Stephanie de Oliveira Duro

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5803-3/4	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	05/08/2014	18/08/2014	30	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5802-3/5	Tópicos Avançados em Toxicologia I	05/08/2014	17/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5818-1/2	Neurotoxicidade Provocada por Xenobióticos e sua Relação com Doenças Neurodegenerativas	29/09/2014	02/11/2014	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5803-3/5	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	24/03/2015	06/04/2015	30	2	100	A	N	Concluída
BMB5795-4/4	Neurociência Básica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	30/04/2015	08/07/2015	120	8	100	B	N	Concluída
BMH5765-2/3	Fundamentos em Biologia do Desenvolvimento (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/08/2015	17/11/2015	225	15	92	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 25/10/2016

Impresso em: 19/12/2016 15:37:42