

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FELIPE BRANDALISE DE ARAÚJO

METODOLOGIAS E EFEITOS DO FUMO PASSIVO E DA NICOTINA EM RATOS WISTAR

CURITIBA  
2015

FELIPE BRANDALISE DE ARAÚJO

METODOLOGIAS E EFEITOS DO FUMO PASSIVO E DA NICOTINA EM RATOS WISTAR

Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, na modalidade de Processos Moleculares, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Drª Claudia Maria Sallai Tanhoffer

Co-Orientador: Prof Dr Edson Antonio Tanhoffer

CURITIBA  
2015

*Aos meus pais, as pessoas que mais amo.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha namorada Juliana, por todo o apoio, amor e compreensão, tenho muito orgulho de nós.

A Luiz e Silvana pelos auxílios (tanto pela força nos momentos difíceis quanto pela ajuda financeira!), tudo o que eu faço é para honrar vocês.

À minha irmã Isabela, também te amo, viu?

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudia Maria Sallai Tanhoffer e ao meu co-orientador Prof<sup>o</sup>. Dr. Edson Antonio Tanhoffer, por todo conhecimento compartilhado e ideias levantadas.

À Rô, por todos problemas por ela solucionados durante minha graduação.

A todos os amigos verdadeiros, de dentro ou de fora do curso, perto ou longe, que me ajudaram a passar por esses anos de formação. Em especial: Guilherme, Harry Potter, Lucas Gonçalves, Leonardo Campos e Bátima. E não posso esquecer da Daniele Brandalise, irmã querida!

## **RESUMO**

O fumo passivo representa um problema de saúde pública, mesmo agora, em época que as legislações estão muito menos tolerantes ao ato de fumar em ambientes fechados. Os problemas causados aos indivíduos que são expostos a essa atividade são incontáveis. Quando os indivíduos são crianças e recém-nascidos, esses problemas são piores, podendo afetar processos de desenvolvimento.

Muitos dos danos fisiológicos e comportamentais ocasionados pela fumaça ambiental do tabaco podem ser analisados através de técnicas simples, sem a necessidade de equipamentos caros. Para outros casos, há uma demanda por técnicas moleculares, um pouco mais complexas. Porém, são estas técnicas simples que dão o pontapé inicial, um primeiro indício para que direção um trabalho mais específico deve seguir.

O presente trabalho tem como objetivo fazer uma revisão das técnicas e metodologias utilizadas para o estudo de danos fisiológicos e comportamentais que a fumaça ambiental do tabaco podem ocasionar, e das doenças relacionadas ao fumo passivo. O foco da revisão são os experimentos realizados em ratos e camundongos. Primeiramente, é feito um apanhado das principais características de um cigarro comum, e as questões legais que atrelam seu uso. Em seguida são abordadas as metodologias e análises, relacionando as técnicas mais utilizadas e os enfoques objetivos de cada uma, além dos experimentos utilizados para ratos e camundongos. Posteriormente, são levantados dados bibliográficos sobre os principais efeitos e doenças ligadas à causa do fumo passivo, tanto em animais quanto em humanos. Por fim, será proposta e discutida uma metodologia de análise de efeitos cognitivos da nicotina isolada ou presente na fumaça do cigarro.

Toda a revisão foi efetuada através das ferramentas de busca pubmed e google acadêmico.

### **PALAVRAS CHAVE:**

fumaça ambiental do tabaco; fumo passivo; técnicas; metodologias.

## **ABSTRACT**

Passive smoke represents a public health problem, even now, in a time that the legislations are much less tolerant to the act of smoking in closed ambients. The problems caused to the individuals that are exposed to this activity are uncouncted. When the individuals are children and new-born, these problems are even worse, what can affect development process.

Much of physiological and behavioral damages occasioned by environmental tobacco smoke can be analyzed by simple techniques, with no necessity of expensive equipments. To another cases, there's a demand by molecular techniques, a little more complexes. However, are these simple techniques that give the kick-off, a first evidence to what direction a work more specific must go.

The present task has as objective make a review of the techniques and methodologies used by the study of physiological and comportamental damages occasioned by the environmental tobacco smoke, and diseases related with passive smoking. The focus of the review are the experimentals realized in rats and mouses. First of all, it's done a summary with the principal characteristics of an ordinary cigarette, and the legal questions that are connected with its use. Secondly are covered the methodologies and analyzes, relating the most used techniques and the objective focus of each one, also the experimentals to rats and mouses. Posteriorly, bibliographic data are collected, with the principal effects and diseases connected to passive smoke's cause, both in animals and humans. Lastly, a methodology to analyses of the cognitive effects of nicotine isolated, or present in the cigarette smoke, will be proposed and discussed.

All the review was performed by research tools pubmed and scholar google.

## **KEYWORDS:**

environmental tobacco smoke; passive smoking; techniques; methodologies.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

FAT	Fumaça ambiental do tabaco
OMS	Organização Mundial da Saúde
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
CO	Monóxido de Carbono
TCA	Teste de Campo Aberto
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LTE	Labirinto em “T” Elevado
LAM	Labirinto Aquático de Morris

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Estrutura química da Nicotina.....	18
<b>FIGURA 2:</b> Exemplo de câmara de exposição.....	22
<b>FIGURA 3:</b> Campo Aberto.....	26
<b>FIGURA 4:</b> Esboço do Labirinto em Cruz Elevado.....	28
<b>FIGURA 5:</b> Labirinto em “T” Elevado.....	29
<b>FIGURA 6:</b> Labirinto Aquático de Morris.....	30

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1:** Efeitos Fisiológicos.....33

**TABELA 2:** Efeitos Comportamentais e Cognitivos.....36

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 O FUMO PASSIVO	11
1.2 LEIS E REGULAMENTAÇÃO	13
1.3 RATOS WISTAR COMO MODELO EXPERIMENTAL	16
2. COMPONENTES DO CIGARRO NA FUMAÇA AMBIENTAL DO TABACO	17
2.1 NICOTINA	17
2.2 ALCATRÃO	19
2.3 MONÓXIDO DE CARBONO	19
2.4 DEMAIS SUBSTÂNCIAS	19
3. METODOLOGIAS	21
3.1 CIGARROS INDUSTRIALIZADOS	21
3.2 CIGARROS DE REFERÊNCIA	23
3.3 ADESIVOS DE NICOTINA	24
4. METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS E ANALÍTICAS	25
4.1 COMPORTAMENTAIS	25
4.1.1 ATIVIDADE MOTORA	25
4.1.2 MEMÓRIA E ANSIEDADE	27
4.1.3 LABIRINTOS	27
4.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E DE PROTEÍNAS	31
5. PRINCIPAIS EFEITOS	33
5.1 FISIOLÓGICOS	33
5.2 COMPORTAMENTAIS E COGNITIVOS	35
CONCLUSÃO E PROPOSTA DE METODOLOGIA	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O FUMO PASSIVO

Os males do cigarro vão muito além dos problemas respiratórios. Através de abordagens específicas, é possível identificar diversos riscos à saúde, de acordo com cada componente do cigarro. Nota-se que os problemas atribuídos ao exercício do fumo ultrapassam a barreira pessoal, atingindo as pessoas ao redor do fumante ativo. Sendo assim, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o tabagismo passivo é definido como a inalação da fumaça de derivados do tabaco por indivíduos não-fumantes, que convivem com fumantes em ambientes fechados (INCA, 2015). As substâncias presentes na fumaça do cigarro no ambiente são as mesmas tragadas pelo fumante, o que possibilita a relação dos danos causados aos fumantes ativos e aos fumantes passivos. Porém, estipula-se que o ar poluído contém cerca de três vezes mais monóxido de carbono e até cinquenta vezes mais substâncias cancerígenas do que a fumaça que entra pela boca do fumante (INCA, 2015). Essa discrepância ocorre por causa da presença do filtro no cigarro, o que diminui a absorção dessas substâncias nocivas do fumante ativo. A fumaça ambiental do tabaco (FAT) contém cerca de 250 substâncias reconhecidamente tóxicas, algumas delas são reconhecidas como agentes indutores de mutação e câncer (REICHERT *et al*, 2008). Segundo o INCA, fumantes passivos têm um risco 30% maior de adquirir câncer de pulmão e 24% maior de infarto do coração do que os não-fumantes.

Um dos estudos epidemiológicos pioneiros comprovando os danos causados pelo tabagismo passivo foi realizado no Japão. Foi feito o acompanhamento, durante 14 anos, de 95540 mulheres com pelo menos 40 anos de idade, não fumantes e casadas com maridos tabagistas ou não. Observou-se mortalidade por câncer de pulmão nas esposas de maridos consumidores de 20 cigarros por dia de 15,5 por 100 mil mulheres. Número que representa quase o dobro da apurada naquelas mulheres cujos maridos não fumavam, de 8,7 por 100 mil (HIRAYAMA, 1981). Desde então, muitos estudos corroboraram estes dados e outros estudos fizeram alertas para outros possíveis danos.

Experimentos realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP demonstraram que a exposição à fumaça de cigarro no período pós-natal (logo após o

nascimento) induziu alterações em processos críticos do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e a diminuição da atividade locomotora na infância e na adolescência.

Resultados do estudo sugerem que a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal causa diminuição na atividade locomotora e efeito ansiogênico, além de induzir prejuízo no aprendizado e memória e na transmissão sináptica em um período crítico do desenvolvimento do SNC (TORRES-PACHECO, 2013).

Estima-se que o tabagismo passivo já chegou a ser a 3ª maior causa de morte evitável no mundo (IARC, 1986). Hoje em dia os relatórios com dados sobre mortalidade e problemas relacionados ao fumo passivo ainda assustam. Os dados expõe riscos de doenças pulmonares, vasculares, cânceres, disfunções hormonais, problemas neurológicos como de atenção e cognição, entre muitos outros que o presente trabalho visa abordar.

De acordo com dados da OMS, cerca de dois bilhões de pessoas são vítimas do fumo passivo no mundo, sendo 700 milhões dessas, crianças. No Brasil, 40% das vítimas do fumo passivo são crianças. Um ponto importante a ser levantado é que, mesmo com leis que desestimulem e proíbam o exercício do fumo em ambientes públicos fechados, nada pode ser feito para evitar o fumo dentro das residências: estimativas apontam que uma em cada quatro crianças brasileiras tem pelo menos o pai ou a mãe fumante, ficando expostas aos efeitos nocivos do cigarro dentro de casa. E mesmo com limpeza, resíduos da fumaça do cigarro podem durar meses dentro de uma casa. Segundo Matt *et al.* (2011), níveis de nicotina no ar das casas de ex-moradores, dois meses após terem mudado dessas casas, ainda ficaram entre 35 e 98 vezes mais altos do que em casas de não-fumantes.

Diante a este panorama, são necessários estudos cada vez mais detalhados, com as mais variadas metodologias para a comprovação de danos e posterior aplicação, principalmente em programas de conscientização da população. Espera-se também que dados obtidos em estudos sejam divulgados, chegando ao conhecimento do público. Do ponto de vista de metodologias aplicáveis para estudos em relação a efeitos e danos de fumo passivo, encontra-se disponível hoje uma vasta gama de opções, em diversos campos do conhecimento. No presente trabalho serão abordadas algumas dessas metodologias, especificamente aquelas utilizando ratos da linhagem Wistar como cobaia, e resultados práticos obtidos.

## 1.2 LEIS E REGULAMENTAÇÃO

Neste ponto oferecemos uma visão geral das leis regentes no Brasil atualmente no combate ao fumo, que dizem respeito principalmente à regulamentação do exercício em ambientes públicos e proibição da divulgação de cigarros em meios de comunicação. A primeira medida efetivada para o combate ao fumo ocorreu no ano de 1988, com a implementação da frase: “o ministério da saúde adverte: fumar é prejudicial à saúde” em todas as embalagens de cigarros comercializadas no Brasil. Essa advertência está contida na portaria nº. 490/88, de 25 de agosto de 1988.

Em 1996 ocorreu o primeiro grande esforço no sentido de regulamentar o exercício do fumo, a partir da Lei Federal 9.294/96, que determina limitações legais específicas e restrições de propaganda, assim como a abdição da sugestão de consumo em meios de comunicação. Ainda em vigor, após diversas modificações e implementações mais rígidas, a Lei se apoiava em dois artigos principais, que diziam:

“Art. 2º É proibido o uso de cigarros, cigarrilhas, charutos, cachimbos ou qualquer outro produto fumígeno, derivado ou não do tabaco, em recinto coletivo fechado, privado ou público, salvo em área destinada exclusivamente a esse fim, devidamente isolada e com arejamento conveniente”.

“Art. 3º A propaganda comercial dos produtos referidos no artigo anterior somente será permitida nas emissoras de rádio e televisão no horário compreendido entre as vinte e uma e as seis horas” (Casa Civil, 1996).

Outras recomendações constavam nesta Lei, estabelecendo restrições, como: não associar o consumo do fumo com práticas esportivas, ou dissociar a ideia do exercício do fumo com o bem-estar e a saúde.

Com a criação da resolução RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 320 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), de 21 de julho de 1999, houve a regulamentação dos procedimentos para registro de produtos fumígenos, sendo revogada pela Resolução RDC nº 105, de 31 de maio de 2001. Ainda em 1999, a Portaria 695/99 do Ministério da Saúde introduziu as seguintes cláusulas de advertência escritas:

- 1- Fumar causa câncer de pulmão;
- 2- Fumar provoca infarto do coração;
- 3- A nicotina é droga e causa dependência;

- 4- Fumar causa impotência sexual;
- 5- Crianças começam a fumar ao verem os adultos fumando; (Ministério da Saúde).

Os anos 2000 começaram com a assinatura da Lei Federal 10.167/00, alterando dispositivos da Lei nº 9.294/96 sobre as restrições ao uso e à propaganda de produtos fumígenos, limitando-os ainda mais. A partir dessa lei ficou proibida a propaganda por meio eletrônico, o patrocínio de eventos (a partir de setembro de 2005), a comercialização em estabelecimentos de ensino e saúde, dentre outras. A propaganda comercial dos produtos ficou limitada basicamente aos pôsteres, painéis e cartazes, na parte interna dos locais de venda (Souza Cruz).

No RDC 46/01 de 2001 ficaram estabelecidos teores máximos de alcatrão (10mg), nicotina (1mg) e monóxido de carbono (10mg), e ainda a cláusula na qual é realizada a seguinte advertência: “não existem níveis seguros para consumo destas substâncias”. Ficou estabelecida ainda a obrigatoriedade da impressão dos teores nas embalagens de todos os maços de cigarros e produtos fumígenos (ANVISA, 2001). Outros dois decretos impuseram obrigatoriedades às indústrias: RDC 105/01, com a necessidade de cadastro das empresas fabricantes e informação sobre a composição dos produtos; e a RDC 14/01, com a obrigatoriedade da veiculação de imagens de advertência.

O ano de 2003 foi o de maior movimentação em regulamentações para a indústria do cigarro. Foram criadas três novas RDC pela ANVISA: a RDC 15/03, que definiu a parte interna dos pontos de vendas de cigarros e afins; a RDC 346/03, estabelecendo novas regras de cadastramento dos produtos fumígenos; e a RDC 335/03, que determinou a inclusão de diversas advertências nos maços e nas caixas de cigarros, todas elas contendo ilustrações referentes às mensagens:

- 1- Esta necrose foi causada pelo consumo do tabaco;
- 2- Fumar causa impotência sexual;
- 3- Crianças que convivem com fumantes têm mais asma, pneumonia, sinusite e alergia;
- 4- Ele é uma vítima do tabaco. Fumar causa doença vascular que pode levar à amputação;
- 5- Fumar causa aborto espontâneo;
- 6- Ao fumar você inala arsênio e naftalina, também usados contra ratos e baratas;

- 7- Fumar causa câncer de laringe;
- 8- Fumar causa câncer de boca e perda dos dentes;
- 9- Fumar causa câncer de pulmão;
- 10- Em gestantes, fumar provoca partos prematuros e o nascimento de crianças com peso abaixo do normal; (ANVISA).

Podem ser observadas as primeiras ações diretas contra o fumo passivo nas mensagens 3 e 10, evidenciando um início de preocupação para essa problemática. Durante os anos de 2006, 2007 e 2008, outros três RDC foram implementadas pela ANVISA. Porém, no ano de 2011 foi iniciado o maior projeto contra o fumo no Brasil, que vai de encontro com a ação do tabagismo passivo: a Lei Antifumo (nº 12.546/2011). O objetivo dessa Lei é manter os ambientes coletivos completamente livres da FAT. Pode ser observada uma alteração importante da Lei Federal 9.294/96, no artigo segundo, que a partir da Lei Antifumo, diz:

“Art. 2º: É proibido o uso de cigarros, cigarrilhas, charutos, cachimbos ou qualquer outro produto fumígeno, derivado ou não do tabaco, em recinto coletivo fechado, privado ou público”.

Assim, ficou proibido até mesmo o popular “fumódromo” em ambientes fechados. No artigo terceiro, houve uma mudança significativa com a proibição da propaganda comercial de cigarro e semelhantes em todo o território nacional, enquanto anteriormente havia a possibilidade de divulgação em veículos de comunicação, desde em que períodos determinados. Outros atos e regulamentos estão contidos na Lei Antifumo (como o aumento nos preços dos cigarros), que teve uma aplicação gradativa pelos estados brasileiros. Porém, a Lei apresenta diversos problemas, sendo desrespeitada principalmente por falhas na fiscalização.

A última regulamentação da Lei Antifumo ocorreu em 2014, com o objetivo ainda mais apurado de proteger a população do fumo passivo e contribuir para a diminuição do tabagismo. Apesar de todos os esforços, o direcionamento correto dos rumos das leis só ocorrerá com muito estudo e pesquisa, em conjunto com regulamentação eficaz e fiscalização correta.

### 1.3 RATOS WISTAR COMO MODELO EXPERIMENTAL

Wistar é uma linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, desenvolvida para uso nos laboratórios. São caracterizados pelas orelhas alongadas, cabeça grande e comprimento da cauda sempre menor que o comprimento corporal. A gestação dura de 20 a 22 dias e o desmame ocorre com 17 a 19 dias de idade. São considerados dóceis, de fácil manipulação e têm boa capacidade de aprendizado (AGUIAR, 2007).

Acredita-se que tenha sido a primeira espécie de mamífero domesticada para fins científicos, pois desde o início do século XX já era usado em pesquisas nutricionais. A espécie de ratos que deu origem à linhagem Wistar é originário de regiões da Ásia Central, acompanhou o homem em seu avanço pelos continentes, sendo encontrada, hoje em dia em praticamente todas as latitudes.

O rato tem um corpo fusiforme e uma cauda que em muitas raças/ linhagens pode chegar a medir mais em comprimento do que o próprio corpo. Em ambientes quentes, procuram locais com sombras ou cavam tocas, adaptam-se melhor ao frio (ANDRADE, 2002).

O advento do rato como animal de laboratório deu-se pela facilidade na criação e manuseio do animal, assim como o curto tempo de gestação e desenvolvimento, o grande número de descendentes por ninhada e as características químicas de seu organismo, semelhantes às dos humanos. Hoje em dia, apesar de haver uma variedade de linhagens de ratos e camundongos utilizados para experimentação, a linhagem Wistar continua sendo a mais comumente usada, e a maior parte dos experimentos comentados neste trabalho são realizados com essa linhagem.

Outros modelos de roedores também comumente utilizados em laboratórios são os camundongos da espécie *Mus musculus*, raças: Swiss, Balb/c, Balb/c NUDE e C57Bl/6 (Biotério USP).

## 2. COMPONENTES DO CIGARRO NA FUMAÇA AMBIENTAL DO TABACO

Os componentes do cigarro são divididos entre porção gasosa (monóxido e dióxido de carbono, por exemplo), e porção particulada (nicotina e alcatrão, principalmente).

### 2.1 NICOTINA

A nicotina (*Nicotina rusticum* e *Nicotina tabacum*) é um alcaloide vegetal (mais especificamente, uma amina terciária) composta de anéis de piridina e pirolidina (FIGURA 1). Sua principal fonte é a planta do tabaco. É sintetizada nas raízes, subindo do caule até as folhas. O conteúdo de nicotina varia de acordo com a planta (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 1987). Após a tragada, a nicotina chega rapidamente ao cérebro atravessando facilmente a barreira hematoencefálica e as membranas celulares de todos os órgãos (SPECTOR, R., GOLBERG, M. J, 1982). A nicotina encontra-se no tabaco sob diversos aspectos: uma fração situa-se na fase particulada e outra na fase gasosa. Quando presente na fase gasosa, a absorção da nicotina pelo organismo é mais rápida (ROBERTSON, C. R., RICHARD, H. D, 1998).

A meia vida da nicotina é em torno de duas horas, enquanto seu principal metabólito, a cotinina, chega a uma meia vida de 40 horas (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1993), sendo as duas substâncias dosadas nas pessoas através do sangue, da urina e da saliva. Após uma manhã em recintos onde se fuma, os fumantes passivos podem ter concentrações de nicotina no sangue equivalentes aos fumantes de três a cinco cigarros (BRIDGES, A. B, et al. 1990). Ela é considerada pela Organização Mundial da Saúde/OMS uma droga psicoativa que causa dependência.

Muitos são os efeitos da nicotina no sistema nervoso central (SNC), alguns dos quais podem ser considerados benéficos, tais como a elevação do humor, excitação, e aprimoramento da aprendizagem e memória (CLARKE, 1992), (POMERLEAU,1992). Segundo Crooks e Dwoskin (1997), a nicotina aumenta o estado de alerta, cognição e memória e reduz a irritabilidade e a agressividade (CROOKS, DWOSKIN, 1997). Por outro lado, em termos farmacológicos, a nicotina é uma das substâncias mais fatais conhecida. A dose letal média para o homem situa-se entre 40 a 60 mg/kg (1 cigarro contém 0,3 a 1mg) (ROSEMBERG, 1981). Pode ainda causar irritabilidade, nervosismo, cansaço, diminuição de

concentração, aumento de apetite e ganho de peso (HUGHES & HATSUKAMI, 1986). Sendo assim, pode tanto melhorar a performance em algumas tarefas quanto diminuir a performance em outras.

A nicotina é considerada a principal e mais nociva substância da FAT, pelo fato de suas propriedades psicoativas e forte potencial dependente, que se deve principalmente à sua ligação aos receptores nicotínicos de acetilcolina. A nicotina liga-se mais comumente aos receptores nicotínicos colinérgicos, encontrados no cérebro, nos gânglios autonômicos e na junção neuromuscular (CHANGEUX, J.P., 1992). A diversidade dos receptores colinérgicos no organismo podem explicar os múltiplos efeitos da nicotina nos humanos, além de apresentar alvos para terapias específicas de ação agonista ou antagonista da nicotina. Além disso, os efeitos neuroquímicos da nicotina incluem a realização de dopamina, norepinefrina e serotonina (efeitos observados em parte dos medicamentos antidepressivos) (ROSE, BEHM & LEVIN, 1993).

Sobre o sistema cardiovascular, a ação se faz fundamentalmente através do estímulo adrenérgico, estimulando a liberação de norepinefrina pós ganglionar e epinefrina da supra-renal (FRANKEN & MARTINEZ, 1980). Como efeitos clínicos, observam-se taquicardia e hipertensão arterial (FRANKEN & MARTINEZ, 1991).

O vício à nicotina depende de sua dose e rota. A inalação da nicotina via fumaça de cigarro parece ser o método de dosagem mais viciante. Após a inalação, a nicotina passa rapidamente ao sangue arterial, e em seguida ao cérebro, o que possibilita efeitos relativamente intensos ao sistema nervoso central (PICKWORTH et al., 1994).

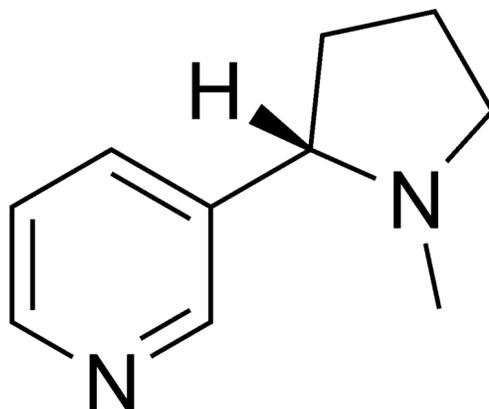


FIGURA 1- "Nicotine-2D-skeletal". Licenciado sob Domínio público.

## **2.2 ALCATRÃO**

O alcatrão não é uma substância única, como é a nicotina, mas sim uma mistura complexa com cerca de 4000 compostos químicos, formados durante a queima, devido à combustão incompleta dos materiais orgânicos presentes nos produtos fumígenos (IARC, 1986).

O alcatrão caracteriza-se por ser uma substância particulada, inalada quando o fumante traga o cigarro, estando um pouco menos presente na FAT. Cada partícula de alcatrão é composta por uma enorme variedade de produtos orgânicos e inorgânicos, muitos com ação carcinogênica comprovados. Destacam-se: benzopireno, dibenzopireno e benzantraceno (LARINI, 1999).

## **2.3 MONÓXIDO DE CARBONO**

Monóxido de carbono (CO), um gás tóxico produzido pela combustão incompleta de hidrocarbonetos, é uma causa relativamente comum de prejuízo humano. Essa toxicidade normalmente é negligenciado pelo fato do CO não possuir gosto nem cheiro e seus sintomas e sinais clínicos não ser específicos (PROCKOP, CHICHKOVA, 2007).

A toxicidade do CO é conhecida pela habilidade que este tem para interferir no transporte de oxigênio. A alta afinidade do CO pela hemoglobina permite que grandes quantidades de CO sejam absorvidas pelo sangue, ocorrendo pouco ou nenhum aumento apreciável de sua pressão parcial (o que dificulta ainda mais a detecção de intoxicação no indivíduo) (KOEPPEN & STANTON, 2009). A ligação do CO à hemoglobina desloca o oxigênio, e dificulta a liberação deste para os tecidos.

## **2.4 DEMAIS SUBSTÂNCIAS**

A FAT contém centenas de substâncias químicas além das citadas anteriormente, tais como formaldeído, benzeno, arsênio, amônia, nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos, em quantidades variadas. A FAT é formada por uma mistura de fumaça central (10-20%) e de fumaça lateral (80-90%). A fumaça lateral é a mais tóxica, mais presente no fumo passivo,

apresentando níveis mais elevados de nicotina, monóxido de carbono, amônia e substâncias cancerígenas (INCA, 2009; MELLO et al., 2005).

Outra substância importante presente nos cigarros e semelhantes é o cádmio, sendo sua excreção lenta e meia-vida biológica longa, de cerca de três décadas, com um efeito cumulativo. O metal também interfere na fosforilação oxidativa, nos canais de cálcio da membrana plasmática, nas Ca-ATPases, impede o reparo de DNA (sendo assim considerado provável agente mutagênico, de indução a tumores) (FURST et al., 1998).

Deve-se alertar ainda o perigo do uso de cigarros contrabandeados, visto que estes apresentam concentração de íons metálicos até onze vezes maiores do que encontrados em cigarros legais, sendo muitos desses íons, metais muito tóxicos (como o Cr, Ni, Cd e Pd) (SILVA, 2014). Estima-se que um em cada quatro cigarros consumidos pela população brasileira é proveniente do contrabando, principalmente pelo baixo valor de venda, muitas vezes de mais de metade do preço de um cigarro legalmente comercializado.

### **3. METODOLOGIAS**

Nesta seção serão discutidos os usos de materiais diversos, de modo a simular efeitos da FAT ou da nicotina isoladamente, em experimentos com ratos (visando preferencialmente a linhagem Wistar). Em cada tópico serão levantadas questões associadas ao advento de cada técnica, algumas vezes de cunho crítico, e alguns trabalhos disponíveis onde as técnicas citadas foram empregadas. Não serão abordados resultados de experimentos.

#### **3.1 CIGARROS INDUSTRIALIZADOS**

A utilização de cigarros comuns, disponíveis para venda representa uma solução mais viável para laboratórios nacionais, já que os cigarros sintéticos de referência devem ser importados, demandando muito tempo e gastos evitáveis. Dois pontos um tanto paradoxais podem ser discutidos na utilização deste material, relacionados à confiabilidade dos dados obtidos.

O primeiro ponto a se observar, que pode ser considerado algo positivo, é que a composição de substâncias nesses experimentos é exatamente a mesma que avaliamos na FAT, tendo em vista que são os mesmos cigarros. Fato este que torna os dados obtidos muito mais concisos, aumentando a confiabilidade ao comparar experimentos com ratos com o que ocorre nos casos populacionais humanos. Quando o objetivo do estudo é trabalhar com um componente isolado da FAT, porém, a utilização dos cigarros industrializados, obviamente, não é a melhor opção.

O segundo ponto está relacionado ao fato da necessidade de haver meios de quantificar as substâncias presentes nos cigarros, tornando a pesquisa mais cara, mais complicada e extensa, caso seja necessário.

O uso de cigarros industrializados pode ser indicado, portanto, a estudos mais generalistas, de análise direta à FAT, sem necessidade de quantificação de substâncias.

A metodologia básica de exposição à fumaça de cigarros industrializados consiste em exposição direta à FAT, por períodos determinados de tempo, diariamente. Normalmente é utilizada uma caixa com ventilação mínima, e um sistema que puxa a fumaça tragada em mangueiras, levando-a até o interior da caixa. Neste sistema, o fluxo laminar de ar comprimido passa de uma região de maior para uma de menor diâmetro, causando redução de pressão no ponto e aceleração do fluxo. Essa metodologia pode ser utilizada em ratos e camundongos tanto recém nascidos quanto jovens e adultos, possibilitando o contato ao fumo passivo em vários períodos do desenvolvimento. É indicado que seja utilizado pelo menos um equipamento que quantifique a taxa de CO do ambiente.

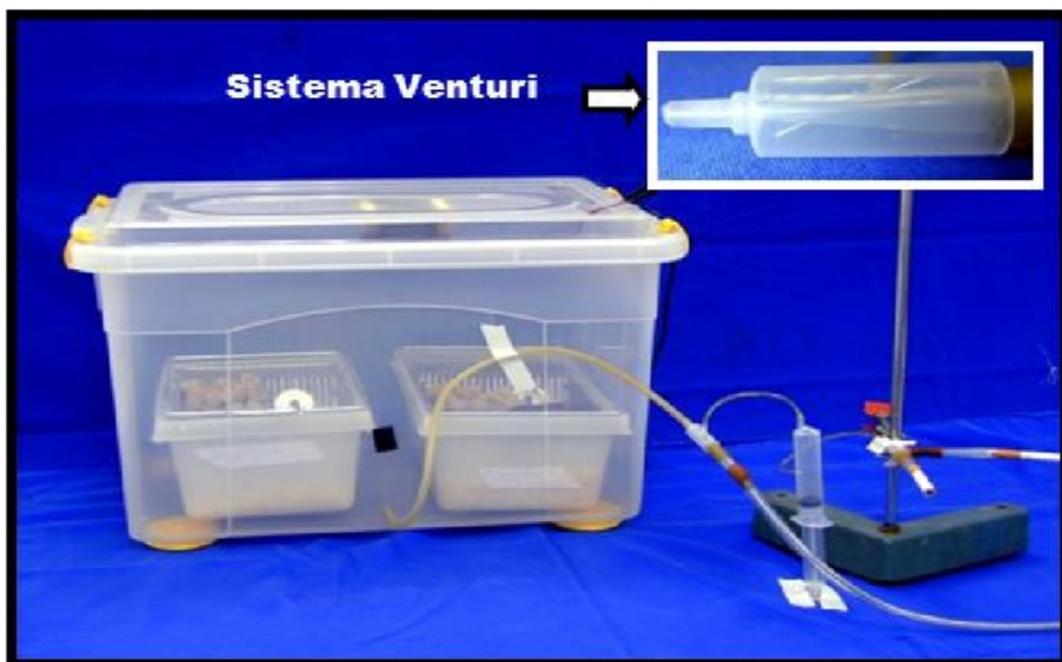


FIGURA 2: Exemplo de câmara de exposição à fumaça do cigarro, utilizada nos experimentos de FAT. Em destaque o Sistema Venturi. Reprodução, (TORRES-PACHECO, 2013).

Alguns estudos visam ainda mesclar a utilização do cigarro com outros materiais, como o álcool. Rivera Oballe (2014), avaliou o efeito da exposição do álcool e/ ou tabaco sobre a perda óssea alveolar espontânea em ratos Wistar machos adultos. A exposição foi de 6 cigarros/60 minutos ao dia. Madeira (2010) utilizou a mescla de exposição de cigarros e ingestão de etanol para estudo histológico em ratos sobre as mucosas da língua e da faringe. Neste estudo também foram utilizados ratos adultos, e a exposição diária à fumaça do

cigarro, nos grupos característicos foi de 10 cigarros/ 30 min.

Outro estudo nacional investigou os efeitos da exposição ao cigarro e ao álcool no sistema respiratório de ratos, em análise imunohistoquímica. Neste caso, a quantidade de cigarros utilizados por dia foi de 5 na primeira semana e 10 na segunda, em exposições de 30 minutos (MAGNANI, 2015).

Uma vasta gama de experimentos apoiam-se na metodologia de exposição à FAT de cigarros industrializados, com resultados nas mais diversas áreas da fisiologia.

### **3.2 CIGARROS DE REFERÊNCIA**

Os chamados cigarros de referência são cigarros sintéticos, com quantificações de substâncias pré-determinadas e confiáveis, e todas as substâncias contidas são conhecidas, permitindo uma padronização entre os experimentos realizados por diferentes laboratórios. A Universidade de Kentucky (EUA) detém os direitos dos cigarros sintéticos de referência mais utilizados mundialmente: os 1R5F, 2R4F e 3R4F. O modo de exposição dos animais de laboratório à fumaça é a mesma que a utilizada nos cigarros convencionais.

A Universidade de Kentucky tem disponibilizado cigarros de referência há 45 anos como um serviço para pesquisas sobre o tabaco, tanto nos Estados Unidos, quanto mundialmente. O primeiro cigarro sintético de referência foi desenvolvido no ano de 1968, sendo o mais recente o 3R4F, cujos resultados estão começando a ser avaliados (Kentucky University web site). Existe a necessidade de reajuste dos valores das substâncias presentes nos cigarros sintéticos ao decorrer das décadas, para parâmetros próximos dos encontrados nas médias dos cigarros comerciais de épocas referentes. Por essa razão, hoje em dia os cigarros 1R5F não são mais utilizados.

A última versão lançada, 3R4F, possui composição de nicotina de 0,726 mg; alcatrão, 14 mg e monóxido de carbono, 11,9 mg, por cigarro. Em comparação a um cigarro comercial Marlboro (0,8 mg; 10 mg; 10 mg, respectivamente, por cigarro) (informada pelo produtor, 2013), são encontradas amplas diferenças. Comparando com outros cigarros comerciais, outras diferenças são encontradas. Após análise dessas variantes, o fato de existir um cigarro onde todas as características sejam iguais e padronizadas é muito importante na pesquisa científica, onde a reprodução fiel de métodos é imprescindível.

Os cigarros de Kentucky são utilizados em ampla escala, para análises semelhantes

aos de cigarros comercializados. No trabalho de doutorado de Torres-Pacheco (2013), a autora utilizou cigarros 3R4F para exposição em camundongos BALB/c, com o objetivo de esclarecer se a exposição à fumaça de cigarro no início do período pós-natal induz prejuízo ao desenvolvimento do SNC na infância, tais como suas possíveis consequências nas fases posteriores da vida. O tempo de exposição à fumaça foi de duas horas, diariamente, nos indivíduos teste, desde o terceiro, até o 14º dia de vida. Muitos trabalhos citotóxicos em diferentes tecidos têm sido desenvolvidos com técnicas de cigarros de referência.

### **3.3 ADESIVOS DE NICOTINA**

O tratamento para abandono do hábito de fumo com adesivos de nicotina é utilizado mundialmente, e suas características que levaram à utilização em laboratórios são a confiabilidade na quantidade de nicotina presente e o método pouco invasivo que representa. Chamado de terapia de reposição de nicotina, este tratamento para cessação do uso do cigarro reduz a satisfação obtida através da nicotina derivada do cigarro, como consequência da dessensibilização dos receptores nicotínicos (LEVIN, et al. 1994).

Os sistemas de transporte transdermal de nicotina liberam de 5 a 22mg por cerca de 16 a 24 horas, dependendo do adesivo. A nicotina é absorvida lentamente, levando ao desenvolvimento de tolerância e poucos, ou nenhum efeito psicológico (BENOWITZ, 1995).

Há poucos trabalhos que utilizam como metodologia a aplicação de adesivos de nicotina em ratos, sendo mais vistos estudos em humanos para corroborar a eficácia da terapia de reposição de nicotina.

Ainda foram encontrados trabalhos que utilizaram a nicotina injetada em ratos e via oral (menos observada).

## **4. METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS E ANALÍTICAS**

Os efeitos ocasionados pela FAT no organismo humano são diversos. Levando em conta toda essa vasta gama de tecidos e sistemas acometidos pelas substâncias do cigarro, não é difícil imaginar a quantidade de metodologias experimentais disponíveis. Nesta seção serão expostos alguns meios de análise para os principais efeitos do fumo passivo, detalhados mais à frente: comportamentais, histológicos e moleculares (estudo de proteínas), em ratos.

### **4.1 COMPORTAMENTAIS**

#### **4.1.1 ATIVIDADE MOTORA**

O ato de fumar não ocasiona efeitos graves na atividade motora de uma pessoa jovem ou adulta. Porém, há evidências que quando na gravidez a mãe fuma, o feto passa a receber as substâncias tóxicas do cigarro através da placenta. A nicotina provoca alterações neurológicas importantes (CARLINI, 2001). Existe a possibilidade destas alterações prejudicarem o controle e a atividade motora do indivíduo em seu desenvolvimento.

Fuller et al. (2012), com o pretexto de que a exposição à FAT está ligada a déficits e desordens de desenvolvimento com conhecido envolvimento do cerebelo, observaram aumento da resposta locomotora em ratos em um ambiente novo. Concluíram que o período pós-natal do desenvolvimento cerebelar é vulnerável à exposição da FAT, resultando em comportamento alterado. Foi utilizado o Teste de Campo Aberto (TCA), com os procedimentos realizados anteriormente por Hall (1941) e modificado por Stohr et al. (1997).

O TCA foi descrito originalmente por Hall (1941) para testar os efeitos de ambientes não-familiares sobre as reações emocionais de ratos. Uma das aplicabilidades recentes tem sido avaliar a propriedade ansiolítica de drogas injetadas no animal (SILVA-FILHO).

O aparato para o TCA consiste de uma larga arena, circular ou quadrática, com diâmetro geralmente de um metro para o teste com ratos, e cercada por paredes para prevenir a fuga dos animais; o piso é usualmente marcado com linhas para permitir uma quantificação da locomoção. A iluminação é variável, e frequentemente intensa para provocar uma adversidade. Medidas comportamentais incluem locomoção (periférica ou central),

“rearings” (encostar as patas nas paredes ou no espaço vazio), autolimpeza, congelamento, assim como defecação ou urinação (medidas de ativação do Sistema Nervoso Autônomo) (RAMOS & MORMÈDE, 2007). Assim, esse teste é válido tanto como avaliação de comportamento e atividade motora, quanto de resposta a estresse incondicionada e exposição forçada.



FIGURA 3: Campo Aberto. Foto: Reprodução (Laboratório de Genética do Comportamento, UFSC).

Há outros métodos comportamentais de avaliação da atividade motora em ratos, muitos deles envolvendo labirintos, que serão analisados em tópicos adiante.

Ijomone et al. (2014) corroboraram a ideia de que o uso crônico da nicotina, em fase adulta não ocasiona efeitos graves na atividade motora de ratos. No estudo foram determinados os efeitos da administração da nicotina via subcutânea, por 28 dias, em funções motoras e coordenativas. Um dos testes utilizados foi justamente o TCA, com 18x18 quadrantes. Outro teste importante no estudo foi o “Step test”, que é usado para mensurar a estabilidade postural. Resultados semelhantes foram obtidos por Tizabi et al. (2009), em estudo incluindo o TCA, para análise de comportamento depressivo após administração de nicotina.

Apesar dos efeitos não significantes da nicotina nos indivíduos jovens e adultos, o mesmo não pode ser dito de recém natos, muito menos em relação à FAT como um todo, levando em conta todas as suas substâncias.

#### **4.1.2 MEMÓRIA E ANSIEDADE**

Memória é definida como a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações. Com relação ao tipo de memória, elas podem ser classificadas de acordo com o tempo, como por exemplo, memória de trabalho (imediate), e de longa duração (consolidada por células especializadas do hipocampo e das áreas do córtex a quais ele se conecta) (IZQUIERDO, 2002). Sendo assim, enquanto a memória de trabalho (também conhecida como operacional) dura de 1 a 3 horas após o aprendizado, a memória de longo prazo pode perdurar por dias, meses ou anos (VIOLA, MONCADA, 2007).

Ansiedade, na literatura clínica, é definida como um estado peculiar caracterizado por hipervigilância não adaptativa e superestimação do potencial de ameaça em situações incertas. Por outro lado, na literatura animal ansiedade é frequentemente definida como um estado comportamental temporário induzido por estímulos ameaçadores difusos (SYLVERS et al., 2011). Em um ambiente novo os animais apresentam um comportamento de avaliação de risco potencial, e confirmando-se um perigo real passam a apresentar um comportamento de fuga ou luta contra o agressor, sendo que essas respostas comportamentais são acompanhadas geralmente de alterações neurovegetativas e hormonais (GRAEFF, 1999).

#### **4.1.3 LABIRINTOS**

Grande parte das pesquisas de experimentação comportamental para medida de memória e ansiedade em ratos utiliza labirintos como teste. São modelos simples e eficazes na avaliação de déficit tanto de memória quanto de ansiedade (ou de possível melhora em ambos, ainda).

Podem ser destacados ao menos três tipos de labirintos para testes: o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e suas variações, o Labirinto em “T” Elevado (LTE) e o Labirinto

Aquático de Morris (LAM).

- Labirinto em Cruz Elevado: o LCE é o mais utilizado em pesquisas de efeitos da FAT e nicotina na ansiedade de ratos e camundongos, com uma vasta gama de trabalhos publicados. Esse teste foi proposto por Handley & Mithani (1984) e validado posteriormente por File et al.(1986). É frequentemente usado para avaliar o comportamento e a ansiedade de roedores em estudos de comportamento, na avaliação de diferentes fármacos, e os efeitos de compostos ansiogênicos e ansiolíticos, e o envolvimento de neurotransmissores nos processos de ansiedade (ANSELONI & BRANDÃO, 1997; CRUZ et al., 1994).

O aparato é elevado acima do nível do chão (cerca de meio metro), e composto por dois braços fechados opostos, perpendicularmente, a dois braços abertos. O teste é baseado na tendência natural de roedores em explorar ambientes novos, e esquia inata de locais desprotegidos, brilhantes e elevados (representados pelos braços abertos). O confinamento aos braços abertos induz sinais psicológicos de estresse (aumento de defecação e níveis de corticosterona), enquanto a exposição a drogas clássicas ansiolíticas, tais como benzodiazepinas, aumentam a exploração a esses braços (FILE, 1986). A exploração normal de um rato ao LCE se dá a 20-25% do tempo em locomoção nos braços abertos. Locomoção acima deste nível é indicativo de ansiedade.

A atividade basal dos animais no LCE é afetado por muitos fatores, tais como as condições da sala onde ocorrem os experimentos, níveis de luminosidade, variações do ciclo circadiano, exposição ao estresse e familiarização com o labirinto (CAMPOS, et al, 2013). A partir da familiarização, podem ser desenvolvidos, ainda, testes simples de memória operacional.

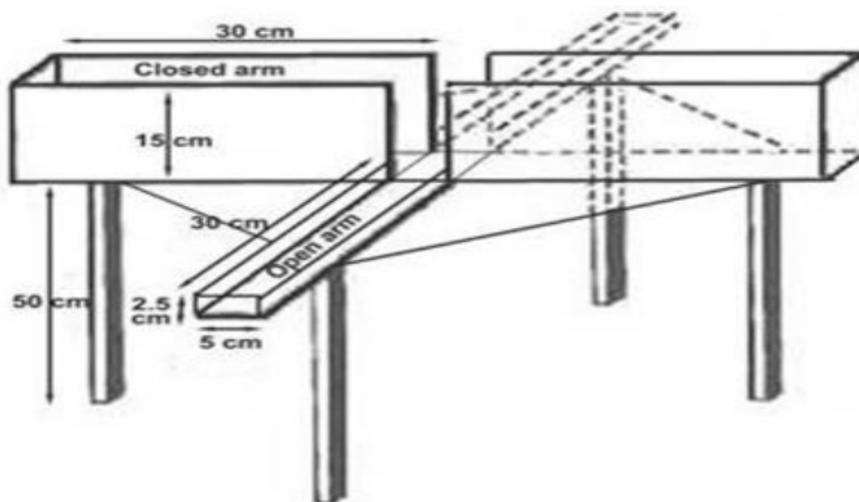


FIGURA 4: Esboço do Labirinto em Cruz Elevado.

- Labirinto em “T” Elevado: outra variação do LCE, proposto originalmente por brasileiros, Graeff et al. (VIANA, GRAEFF et al., 1994), consiste de três braços: um fechado por uma parede lateral, perpendicular aos outros dois braços opostos, abertos e de dimensões iguais.

O modelo em questão possibilita mensurar dois comportamentos diferentes no mesmo animal: a resposta condicionada, representada pela esquiva inibitória, o tempo que o animal leva para, quando colocado no braço fechado, alcançar um dos braços abertos (relacionada a ansiedade generalizada) e a resposta incondicionada, representada pelo comportamento escapatório aos braços fechados quando o animal é posicionado nas extremidades destes braços (relacionada a desordens de pânico). O LTE não é amplamente difundido entre os experimentos de ansiedade, apesar da disponibilidade de diversas drogas, com respostas variadas relacionadas ao labirinto.

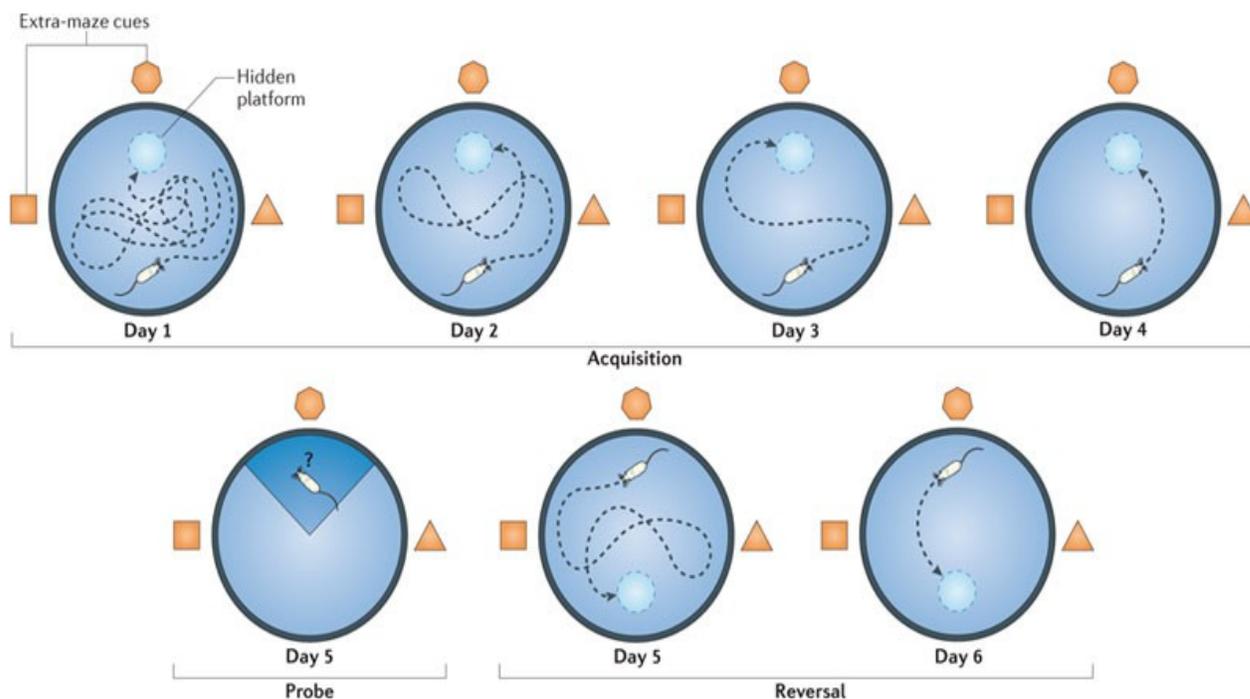
Huang et al.(2007) realizou experimento com técnica de administração oral de nicotina em ratos Wistar recém-natos (doses de 6 mg/quilo/dia), durante sete dias. Foram realizados testes de LTE na fase neonatal, para análise de possível aumento na ansiedade, com resultados positivos. Posteriormente, na fase adulta, os testes foram repetidos sem causar o mesmo efeito. Este estudo é importante na avaliação de métodos de abandono ao fumo.



FIGURA 5: Labirinto em “T” Elevado. Foto: UFMG.

- Labirinto Aquático de Morris: o teste de LAM é uma importante ferramenta no estudo de avaliação de memória de ratos. A sua simplicidade não condiz com a importância dos

seus resultados possivelmente obtidos, concisos. Proposto por Morris et al.(1982), pode ser considerado um teste de memória operacional hipocampo-dependente.



Nature Reviews | Immunology

FIGURA 6: Labirinto Aquático de Morris. Reprodução: KIPNIS et al. (2012).

O aparato do labirinto é simples e reproduzível em laboratórios com poucos recursos financeiros (representado na FIGURA 6, “Day 1”): uma piscina circular preenchida por água opaca (adicionando pigmento branco, como leite em pó) e uma plataforma elevada até próximo à superfície da piscina, escondida (“Hidden plataforma”). Em volta à piscina, geralmente nas paredes, pistas visuais tem o propósito de utilização como guia de localização aos ratos (“Extra-maze cues”).

A metodologia básica do LAM é representada na FIGURA 6: na primeira vez em que é colocado na piscina, o rato tende a procurar um local seguro, no caso, a plataforma, mas demora um pouco a encontrá-la (day 1). Nos dias seguintes de teste, o tempo para encontrar a plataforma tende a ser diminuído, até chegar um momento em que, quando posicionado na água, o indivíduo nade diretamente à plataforma, quase em linha reta (day 4). A partir deste momento, pode ser efetuada a troca de localização da plataforma, levando o rato a “re-aprender” a tarefa (day 5, day 6).

O LAM possui características próprias, mas suscetível a variações de parâmetros, tais como: presença, ausência ou número de pistas visuais; tempo de permanência de cada indivíduo na água; mudança de posicionamento da plataforma; intervalo de re-teste; número de dias de testes; dentre outros.

#### **4.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E DE PROTEÍNAS**

As análises de tecidos de indivíduos submetidos ao exercício do fumo passivo tem como ligação direta a detecção de edemas, tumores e lesões variadas. Em humanos o material mais comum para esse tipo de análise é proveniente de mucosas. Em ratos existe a possibilidade de remoção de órgãos, aumentando a gama de tecidos possíveis para estudo.

Outra utilidade importante de análises histológicas está na identificação e quantificação de proteínas. Um trabalho de Semenzati (2012, Tese de Doutorado), levou em conta estudos histológicos e imunohistoquímicos afim de determinar os efeitos da exposição à FAT sobre as mucosas da língua, faringe e laringe, em ratos Wistar. Foram analisadas as proteínas p53 e Ki-67, que são considerados marcadores tumorais, sendo encontrados focos de hiperplasia em todos os tecidos.

Algumas das substâncias da fumaça do cigarro são produtoras de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, afetando funções celulares como aquelas dos ribossomos ou das mitocôndrias, promovendo estresse oxidativo e neurodegeneração (RAMACHANDRAN et al., 2007). Estresse oxidativo pode ser descrito como o excesso de radicais livres presentes no organismo, apresentando efeitos deletérios e prejudiciais ao indivíduo. O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta (BARREIROS, 2006). As proteínas produzidas para combate aos radicais livres podem ser quantificados, a partir de amostras de urina, sangue, entre outras. Técnicas moleculares podem auxiliar também, possibilitando a avaliação dos níveis de expressão de diferentes proteínas. A utilização de ferramentas moleculares como a PCR e a eletroforese (e todas suas variações técnicas) tem se mostrado cada vez mais fundamentais no estudo de diferentes áreas do conhecimento científico. Através de uma dessas técnicas (Western Blotting), foi realizado um estudo de quantificação de proteínas GLUT4 (envolvida com o transporte de glicose). O objetivo do estudo foi analisar o efeito que o tabagismo passivo e o exercício associado exerce sobre a expressão das proteínas GLUT4. Verificou-se que o fumo

tem um importante efeito negativo sobre o metabolismo glicídico em tecidos musculares esqueléticos (tipo I e tipo IIb) e cardíaco (SILVA, 2009).

A análise de proteínas é fundamental no caso de humanos, por envolver metodologias pouco invasivas e muito eficazes na descoberta e acompanhamento do avanço de muitas doenças associadas ao exercício do fumo e ao fumo passivo. Winden et al. (2014) observou níveis elevados de expressão de uma proteína do epitélio pulmonar (RAGE), na prole de ratas expostas ao fumo passivo. A proteína RAGE media uma sinalização pró-inflamatória nos pulmões.

Há uma vasta gama de estudos recentes disponíveis que associa o fumo com a expressão excessiva ou diminuta de proteínas.

## 5. PRINCIPAIS EFEITOS

A disponibilidade de estudos relacionados aos efeitos do fumo passivo em indivíduos humanos, a partir de pesquisas com ratos, é relativamente extensa. A variedade de desordens fisiológicas e comportamentais observadas é elevada. A seguir serão expostos tópicos com alguns dos principais efeitos (1) fisiológicos e (2) comportamentais (danos na coordenação, memória e aprendizagem e aumento de ansiedade) observados em experimentos com ratos e/ou estudos de casos em humanos. Além disso, serão explicitados alguns danos no desenvolvimento do feto, no caso de fumo durante a gravidez. Não serão considerados aqui os efeitos imediatos, como irritação dos olhos e nariz, dor de cabeça, dor de garganta, tosse e tonturas.

### 5.1 FISIOLÓGICOS

Efeitos Fisiológicos				
Efeito/ Desordem	Fase da Vida	Trabalho	Metodologia Experimental	Metodologia Analítica
Otite Média com Efusão	Infância	LICALI et al. (1999)	Estudo epidemiológico com humanos	Análise estatística de grupos
Redução do Crescimento	Infância	MAGNANI et al. (2012)	Exposição à fumaça de cigarro	Medição corpórea e de órgãos
Redução do Crescimento	Infância	GONÇALVES-SILVA et al. (1997)	Exposição à fumaça de cigarro	Pesagem corpórea
Doenças Respiratórias Crônicas	Infância	CHEN et al. (1986)	Estudo Epidemiológico	Análise estatística de grupos
Doenças Respiratórias Crônicas	Infância	ARAÚJO, SILVA & VABO (2006)	Estudo Epidemiológico com humanos	Análise estatística de grupos
Câncer de Pregas Vocais	Fase Adulta	DUARTE et al. (2001)	Exposição à fumaça de cigarro	Análise histológica
Lesões Pulmonares (nicotina)	Fase Adulta	MEDEIROS, et al. (2003)	Injeção Subcutânea de Nicotina	Análise histopatológica
Danos Renais	Fase Adulta	BANDIERA, S. (2015)	Exposição à fumaça de cigarro	Análises morfológicas

TABELA 1: Efeitos Fisiológicos.

- Otite média com efusão: Caracteriza-se pela presença crônica de secreção na cavidade da orelha média, com uma membrana timpânica íntegra e sem sinais de inflamação aguda, persistindo no mínimo por oito semanas. É uma das afecções mais frequentes na infância, sendo a causa mais comum de perda auditiva (BECKER, 2003).

Segundo Ilicali et al. (1999), após um estudo de caso com crianças da Clínica de Otorrinolaringologia da Escola de Medicina de Istanbul, Turquia, o fumo passivo foi um fator de risco significativo para o desenvolvimento da otite média.

- Redução do crescimento: Apesar da dificuldade na determinação de uma média normal de crescimento corpóreo entre indivíduos, visto que existem variáveis determinantes genéticas e ambientais, principalmente em humanos, alguns estudos comprovam diferenças morfológicas em diferentes órgãos de ratos. Magnani et al. (2012) executou um modelo experimental de investigação de possíveis danos nos pulmões e crescimento, em ratos Wistar sob efeito da FAT e consumo de álcool em quatro grupos: controle, tabaco, tabaco + álcool e álcool. Seus resultados, após observação por microscopia eletrônica, mostraram alterações morfológicas em todos os grupos experimentais (excluindo controle), com o tabaco sendo o agente mais prejudicial sobre o comprimento dos espécimes, e o álcool no peso. Em outro experimento com ratos Wistar, notou-se que o tabagismo passivo interferiu significativamente no peso corporal de animais adultos e jovens, além de diminuir o crescimento corporal dos jovens, muito em função da diminuição do consumo alimentar. Assim, apesar da manifestação morfológica de redução de peso ocorrer principalmente na fase jovem, vale ressaltar que é um processo longo, onde a maior parte da exposição à FAT ocorre durante a gravidez ou na infância.

- Doenças respiratórias crônicas: A maior parte dos dados obtidos na literatura e nos trabalhos publicados mundialmente sobre os danos respiratórios causados pela FAT é relacionada a estudos epidemiológicos, de caráter estatístico e regional. Em um estudo chinês, houve o levantamento de 1163 bebês nascidos entre junho e dezembro de 1981 em bairros de Shangai, e a proposta para que os pais desses bebês respondessem a um questionário (das quais 97 famílias negaram-se). Os resultados foram alarmantes, contribuindo pelo início da preocupação ao fumo passivo: em famílias que não possuíam

fumantes na residência, a taxa de risco relativo do bebê possuir alguma doença respiratória crônica foi de 6,80%. Nas famílias em que havia o uso de dez ou mais cigarros por dia, essa taxa subia para 12,24% (CHEN, LI & YU, 1981). Crianças expostas ao fumo por parte dos seus pais podem ter tosse crônica e asma, e maiores chances de ataques de amigdalite, pneumonia, bronquite, e outras doenças respiratórias (FERGUSON, 1981; COLLY, 1974).

No Brasil, um estudo epidemiológico reuniu 217 crianças em idade escolar, entre sete e dez anos, com o objetivo de comparar a prevalência de sintomas de doenças respiratórias de fumantes passivas ou não fumantes passivas. Verificou-se que 25,47% das crianças expostas ao fumo passivo possuíam coriza e 24,52%, rinite. Das crianças que não eram expostas, apresentou 9% de coriza e 3,4% de rinite (ARAUJO, SILVA & VABO, 2006).

- Câncer de prega vocal: Um dado curioso diz respeito à possibilidade de desenvolvimento de câncer nas pregas vocais, a partir da inalação passiva da FAT, em indivíduos jovens ou adultos. O estudo foi realizado com ratos Wistar de aproximadamente 60 dias de vida, em metodologia comum de exposição a cigarros convencionais. Os grupos de estudo foram separados por tempo, controle e experimental, em intervalos de 25 dias, 50 dias e 75 dias de tratamento. As análises histológicas das pregas vocais ocorreram nos intervalos citados, para comparação da evolução de uma possível neoplasia. De acordo com os resultados alcançados, pode-se concluir que a inalação passiva de fumaça de cigarro provoca alterações morfológicas na laringe de animais, especialmente nas pregas vocais, levando ao risco de ocorrência de neoplasia (DUARTE, et al. 2006).

- Lesões pulmonares: Há indícios de que a nicotina isoladamente também exerça lesões pulmonares. De acordo com Medeiros et al. (2003), os dados obtidos permitiram concluir que o uso da nicotina via subcutânea contribuiu para o aparecimento de lesões pulmonares em ratos, em número e intensidade. São necessários estudos para corroborar essa hipótese no caso do fumo passivo, visto que a metodologia aplicada neste estudo foi de injeção subcutânea da nicotina.

- Danos renais: Na dissertação de mestrado de Bandiera (2015), foram verificadas possíveis alterações hepáticas e renais em ratos expostos ao álcool e FAT, bem como sua associação. Novamente houve a constatação de que a fumaça do cigarro induz a redução de

ganho de peso e gordura em ratos, e morfologicamente, o risco de dano renal de fato foi aumentado com a inalação da fumaça do cigarro. Também está comprovado que o fumo durante a gravidez está relacionado com maior incidência de queda ponderal de peso do feto, prematuridade, aborto e mortalidade neonatal (TARANTINO, 1982).

## 5.2 COMPORTAMENTAIS E COGNITIVOS

A nicotina, principal componente psicoativo do cigarro, aumenta o estado de alerta, cognição e memória, além de reduzir a irritabilidade e a agressividade (CROOKS & DWOSKIN, 1997). Porém, a partir de concentrações mais elevadas, esse estado de alerta pode se elevar a um patamar de ansiedade. Vale ressaltar que a FAT possui outras substâncias que, agindo em conjunto com a nicotina, pode causar variados efeitos que não propriamente os da nicotina isolada, obviamente.

<b>Efeitos Comportamentais e Cognitivos</b>				
<b>Efeito/ Desordem</b>	<b>Fase da Vida</b>	<b>Trabalho</b>	<b>Metodologia Experimental</b>	<b>Metodologia Analítica</b>
Alteração Motora	Neo-natal	FULLER et al. (2012)	Teague TE*	TCA e Histologia
Alteração Motora/ Ansiedade	Juventude	MARTINI (2010)	Inalação	TCA e LCE
Alteração Comportamental	Pré-natal	AMOS-KROOHS (2013)	Teague TE*	LAM e LCE
Memória e Aprendizagem	Pré-natal	YANG et al. (2008)	Inalação	LAM
Memória	Pré-natal	LEVIN et al. (1996)	Nicotina Crônica	LCE

TABELA 2: Efeitos comportamentais e cognitivos.

- Alteração motora: Sabe-se que a nicotina do cigarro produz um pequeno aumento na frequência cardíaca, na pressão arterial, na frequência respiratória e na atividade motora (CARLINI, 2001). O TCA é a ferramenta ideal para identificar essas mudanças na atividade motora, amplamente utilizado em trabalhos com roedores, como no de Fuller et al. (2012). O objetivo primário de seu trabalho foi analisar a mudança neuroquímica do cerebelo de ratos recém-natos, utilizando microscópio de imunofluorescência. Após a metodologia de inalação e antes da retirada dos órgãos, os ratos foram aproveitados vivos para o TCA. Os resultados dos experimentos mostraram que houve perturbação no metabolismo energético mitocondrial

no cerebelo, sugerindo um efeito no controle local, além de observar aumento na locomoção e no comportamento estereotipado em alguns casos. A metodologia experimental, de inalação à FAT, foi aplicada através de um sistema de inalação da empresa “Teague”\*(Disponível em [www.teague-ent.com](http://www.teague-ent.com)).

Experimentos de Martini (2010) com ratos Wistar afirmam que os danos provocados pela nicotina na alteração motora também podem ocorrer com a exposição à FAT na juventude, sendo observado ainda aumento de ansiedade.

- Alteração comportamental: Característica de fácil observação em diferentes tipos de labirintos. Amos-Kroohs (2013) utilizou de LCE, LAM, dentre outros testes, obtendo diferentes respostas, com alguns destaques. Os camundongos do grupo experimental tiveram um desempenho abaixo do normal no LCE, demonstrando hipo-atividade, além de apresentarem longos períodos de latência no LAM. O dado mais importante foi a observação de uma resposta de dimorfismo sexual no TCA após um tratamento com metanfetamina: os machos responderam com diminuição da locomoção natural, e as fêmeas obtiveram uma resposta acima do normal, com locomoção exacerbada, o que reforça a hipótese de possíveis contribuições genéticas nas diferentes respostas à presença da nicotina em cada organismo.

Eppolito & Smith (2006) utilizaram o LAM para testar os efeitos comportamentais ocasionados pela utilização da nicotina em ratos, em fases pré-natal e recém nascidos. A nicotina foi administrada via subcutânea.

- Memória e Aprendizagem: O fumo passivo afeta a memória e a aprendizagem em animais, entre outros motivos, pois prejudica os processos de mielinização e de sinaptogênese. Diminuição dos níveis de BDNF (fator neurotrófico envolvido na manutenção da sobrevivência neuronal e na plasticidade sináptica) e da sinapsina no hipocampo, cerebelo, córtex pré-frontal e estriado também estão relacionados com o fumo passivo (TORRES-PACHECO, 2013). Porém, especula-se que as causas para que estes distúrbios ocorram podem não estar envolvidos completamente com a nicotina. A nicotina e outros agonistas nicotínicos tem sido relacionados com melhoria na performance em testes de atenção e memória. Inclusive, estudos clínicos usando adesivos de nicotina tem demonstrado a eficácia da nicotina no tratamento de prejuízos cognitivos associados à

doença de Alzheimer, esquizofrenia e déficit de atenção/ desordens de hiperatividade (REZVANI & LEVIN, 2000). Ao confirmar-se os benefícios desta metodologia, o tratamento com nicotina pode representar importante alternativa, por uma relação positiva de custo-benefício.

Por outro lado, há evidências de que em ratos recém-natos a nicotina ocasione efeitos na performance cognitiva que podem ser elucidados em desafios comportamentais e farmacológicos. Esses efeitos podem estar ligados com déficits cognitivos nas crianças, após o exercício do fumo por parte da mãe, durante a gravidez (LEVIN, 1996).

Existem muitos estudos sobre a influência do fumo no desenvolvimento intelectual em crianças e o impacto em mulheres grávidas expostas à FAT. Porém, poucos estudos tem buscado explorar meios de prevenir as mulheres grávidas de serem expostas a tal ambiente. O trabalho de Yang et al. (2008) buscou determinar o impacto do fumo passivo e o efeito protetor de antioxidantes como a vitamina E e a quercetina na aprendizagem e memória de ratos recém-natos. O efeito oxidativo que a fumaça do cigarro pode gerar já foi relatado anteriormente.

## CONCLUSÃO E PROPOSTA DE METODOLOGIA

Sabe-se que o fumo passivo é um problema que acomete a população como um todo à medida que a sociedade aumenta de indivíduos. Os principais efeitos causados pelo fumo passivo em um indivíduo jovem ou adulto já foram comprovados e observados em estudos epidemiológicos, como doenças respiratórias (tais como rinite, asma e bronquite). Alterações motoras, ansiedade, possibilidade do desenvolvimento de cânceres nas vias respiratórias, e vício à nicotina, o que pode levar um indivíduo que nunca havia fumado na vida a iniciar o hábito tabagista, também estão entre estes efeitos. As políticas públicas, especificamente brasileiras, têm conseguido diminuir muito a exposição da população não fumante à FAT, com leis anti-fumo em ambientes fechados ou parcialmente fechados e campanhas de conscientização.

Porém, a maior preocupação dos órgãos de saúde está no ato do fumo dentro das residências, visto que não estão protegidas pelas leis anti-fumo. Neste caso, a exposição dos outros familiares à FAT é certa, aumentando o índice de pessoas com doenças respiratórias adquiridas. A única arma que o ministério da saúde tem contra o fumo dentro das residências é a conscientização. Outro fator que ainda assusta é o fumo durante a gravidez, o que pode causar problemas no feto, que perdurará pela vida inteira do indivíduo, como redução do tamanho corporal e do peso, além de doenças respiratórias crônicas.

As metodologias para o estudo de alterações motoras, de memória e ansiedade ocasionadas pelo fumo passivo são relativamente simples e dinâmicas, com a possibilidade de sofrerem modificações entre variáveis como tempo de exposição do grupo experimental às substâncias, fase da vida do grupo experimental (idade), alterações nos labirintos, dentre outras. Os trabalhos epidemiológicos também são de suma importância, visto a necessidade de levar os dados laboratoriais para a sociedade e possivelmente corroborá-los.

As técnicas histológicas e moleculares são imprescindíveis no estudo de carcinomas e estresse oxidativo, com resultados recentes admiráveis. Porém, ainda são necessários estudos que expliquem os mecanismos da nicotina no organismo, tendo em vista os seus diversos efeitos muitas vezes contrastantes. Outro fator considerável no estudo do fumo passivo é a impossibilidade de isolar os distúrbios causados pela FAT com os causados apenas pela nicotina.

Tendo em vista essa dificuldade de discernir os efeitos que a nicotina isoladamente

acarreta e o que é causado pelas outras substâncias da FAT, uma proposta de metodologia foi elaborada. O objetivo dessa metodologia é avaliar os efeitos na memória e ansiedade de ratos Wistar tratados com nicotina pura ou com a fumaça do cigarro, simulando os ambientes onde pode ocorrer o exercício do fumo passivo. Para isso, inicialmente três grupos são necessários:

- Grupo controle: tratado apenas com água e ração;
- Grupo nicotina: tratado com água, ração e doses diárias de nicotina. Optou-se pela utilização dos adesivos de nicotina, por prezar pela integridade dos ratos;
- Grupo FAT: tratado com água e ração, expostos diariamente à fumaça de cigarros industriais em câmara (como exposta na FIGURA 2).

Em seguida ao tratamento, os grupos serão submetidos ao LAM e LCE, para testes de memória e ansiedade. Existe a possibilidade dos tratamentos ocorrerem em diversos períodos da vida dos animais.

Uma segunda ideia de proposta de metodologia é levantada a partir da constatação comentada no item 1.1, em estudo de Matt *et al.* (2011). As partículas liberadas durante a queima do cigarro espalham-se pelos elementos do ambiente, permanecendo em móveis, chão e paredes por grande período de tempo. Tendo em vista a ausência de trabalhos de simulação de restícios da FAT com ratos, imagina-se uma metodologia para avaliação dos possíveis efeitos das substâncias do cigarro espalhadas pelo cipilho das celas dos ratos. Posteriormente, é proposta a avaliação de filhotes e recém-nascidos neste ambiente em tarefas discutidas neste trabalho, como o LAM e o LCE.

Por fim, espera-se que esforços adjuntos de diferentes órgãos e universidades brasileiras continuem a ajudar a reduzir cada vez mais as vítimas do fumo passivo, e que a população cada vez mais tenha consciência dos riscos e dificuldades que este hábito pode ocasionar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, RODRIGO (2007) Ratos Wistar. Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa. Centro de Bioterismo. Universidade de São Paulo.
- AMOS-KROOHS, R.M.; WILLIAMS, M.T.; BRAUN, A.A.; GRAHAM, D.L.; WEBB, C.L.; BIRTLES, T.S.; GREENE, R.M.; VORHEES, C.V.; PISANO, M.M. (2013) Neurobehavioral phenotype of C57BL/6J mice prenatally and neonatally exposed to cigarette smoke.
- ANDRADE, A.; PINTO, SC.; OLIVEIRA, RS. (2002) Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ. 388p. cap.15, pg.119-121.
- ANSELONI, V.Z.; BRANDÃO, M.L. (1997) Ethopharmacological analysis of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. Behavioural Pharmacology, 8, pg.533-540.
- ARAÚJO, A.M.F.; SILVA, A.H.M.F.T.; VABO, R.V. (2006) Prevalência de sintomas e doenças respiratórias em crianças na idade escolar, fumantes ou não-fumantes passivas.
- BANDIERA, Solange. (2015) Alterações hepáticas e renais em ratos expostos ao álcool, fumaça de cigarro ou sua associação. Dissertação de mestrado- UFRGS.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Quim. Nova, Vol.29, Nº1, pg.113-123.
- BECKER, C.G.; SILVA, A.L.; GUIMARÃES, R.E.S.; BECKER, H.M.G; BARRA, I.M.; OLIVEIRA, W.D. (2003) Tratamento cirúrgico da otite média com efusão: tubo de ventilação versus aplicação tópica de mitomicina C.
- BENOWITZ, N.L. (1995) Clinical pharmacology of transdermal nicotine. Eur. J. Pharm. Biofarm 41, pg.168-174.
- BRIDGES, A. B., COMBS, J. B., HUMBRE, J. W. et al.,(1990) Population characteristic and cigarette yields as determination of smoke exposure. Pharmacol Bioetiém Behavior. 37:17.
- CAMPOS, A.C.; FOGAÇA, M.V.; et al. (2013) Animal models of anxiety disorders and

stress.

- CARLINI, E. A., et al. (2001) Drogas psicotrópicas: o que são e como agem. Revista IMESC, nº3.
- CHANGEUX, J.P.; GALZI, J.L.; DEVILLERS-THIERY, A.; BELTRAND, D. (1992) The functional architecture of the acetylcholine nicotine receptor explored by affinity labeling and site-directed mutagenesis.
- CHEN, Y.; LI, W.; YU, S. (1981) Influence of passive smoking on admissions for respiratory illness in early childhood.
- CLARKE PBS, (1992) Nicotine and smoking: A perspective from animal studies. Psychopharmacology 92: 135-143, 1987.
- COLLY, J.R.T; HOLLAND, W.W.; CORKHILL, L.T. (1974) Influence of passive smoking and parental phlegm on pneumonia and bronchitis in early childhood.
- CRUZ, A.P.M.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. (1994). Ethopharmacological analysis of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 49. Pg.171-176.
- DUARTE, J.L.; CARDOSO, F.A.; CEOLIN, D.S.; CESTARI, T.M.; ASSIS, G.F. (2006) Efeitos da inalação passiva da fumaça de cigarro sobre as pregas vocais de ratos.
- EPPOLITO, A.K.; SMITH R.F. (2006) Long-term behavioral and developmental consequences of pre- and perinatal nicotine.
- FERGUSSON, D.M.; HORWOOD, L.J.; SHANNON, F.T.; TAYLOR, B. (1981) Parental smoking and lower respiratory illness in the first three years of life.
- FRANKEN, R.A.; MARTINEZ, E.E.; SASSO, S.W. (1980) Histoquímica da fibra muscular cardíaca de ratos jovens e senís sob a influência da nicotina. Arq Bras Cardiol, 34, pg. 289-293.

- FRANKEN, R.A.; MARTINEZ, E.E.; SASSO, S.W. (1991) Ultraestrutura da fibra muscular cardíaca de ratos jovens e senís sob a ação da nicotina. *Aq Bras Cardiol*, 36, 171-179.
- FULLER, et al. (2012) Exposure of rats to environmental tobacco smoke during cerebellar development alters behavior and perturbs mitochondrial energetics.
- FURST, A.; RADDING, S.B.; WURZEL, K.A, (1998). In: WEXLER, P. *Encyclopedia of Toxicology*. San Diego: Academic.1 v.605 p.207-209: Cadmiun.
- GOLÇALVES-SILVA, R.M.V.; LEMOS-SANTOS, M.G.; BOTELHO, C. (1997) Influência do tabagismo no ganho ponderal, crescimento corporal, consumo alimentar e hídrico de ratos.
- GRAEFF, F.G. (1999) Ansiedade. In: Graeff, F.G.; Brandão, M.I.; (Eds). *Neurobiologia das doenças mentais*. 5ª Ed.; São Paulo: Lemos Editorial, pg144.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behavior. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 327. Pg1-5.
- HIRAYAMA, T., 1981. Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. *Br Med J* 282, 183-185.
- HUANG, L.Z.; LIU, X.; GRIFFITH, W.H.; WINZER-SERHAN, U.H. (2007) Chronic neonatal nicotine increases anxiety but does not impair cognition in adults rats.
- HUGHES, J.R.; HATSUKAMI, D. (1986) Signs and symptoms of tobacco withdrawal. *Arch. Gen. Psychiatry*, 43. Pg. 289-294.
- IARC (1986). International Agency for Research on Cancer Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans- Tobacco Smoking- vol. 38/ 1986.

- INCA (Brasil), (2009) BRASIL: Advertências sanitárias nos produtos de tabaco 2009. Rio de Janeiro: INCA, 2009. 59p.
- IJOMONE, O.M. et al. (2014) Performance of motor associated behavioural test following chronic nicotine administration.
- ILICALLI, O.C.; KELES, N.M.D.; et al. (1999) Relationship of passive cigarette smoking to otitis media.
- IZQUIERDO, I.; VIANNA, M. R.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; SZAPIRO, G.; COITINHO, A.S.; MULLER, L.; CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H. (2002) Memory retrieval and its lasting consequences. Neurotox Res. 4(5-6).pg. 573-593.
- Kentucky University web site (como visto em 06/05/2015). <http://www2.ca.uky.edu/refcig/>.
- KIPNIS, J.; GADANI, S.; DERECKI, N. C. (2012) Pro-cognitive properties of T cells. Nature Reviews Immunology 12, pg.663-669.
- KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A, (2009). Berne & Levy: Fisiologia- 6ª ed, Mosby, p.463.
- LARINI, L. (1999) Toxicologia das praguicidas. São Paulo: Manole, 230 p. Cap. 4, p.93-98: Inceticidas de Origem Vegetal.
- Lei Federal nº 9.294/96, disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l9294.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9294.htm)
- Lei Federal nº 10.167/00, disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L10167.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L10167.htm)

- Lei Federal nº 12.546/11, disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2011-2014/2011/lei/l12546.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2011/lei/l12546.htm)
- LEVIN, E.D.; WESTMAN, E.C.; STEIN, R.M.; CARNAHAN, E.; SANCHEZ, M., et al. (1994) Nicotine skin patch treatment increases abstinence, decreases withdrawal symptoms, and attenuates rewarding effects of smoking.
- LEVIN, E.D.; WILKERSON, A.; JONES, J.P.; CHRISTOPHER, N.C.; BRIGGS, S.J. (1996) Prenatal nicotine effects on memory in rats: pharmacological and behavioral challenges.
- MADEIRA, S. L. M. (2010). Efeitos da exposição à fumaça de cigarro e a ingestão crônica de etanol sobre as mucosas da língua e da faringe: estudo histopatológico em ratos: UNESP.
- MAGNANI, K.L; CATANEO, D.C.; CAPELOZZI, V.L.; DEFAVERI, J.; HASIMOTO, E.N.; CATANEO, A.J.M. (2012) Estudo morfológico dos pulmões e crescimento de ratos expostos à fumaça do cigarro e ao álcool.
- MAGNANI, K. L. (2015). Respiratory immunohistochemical study in rats exposed to cigarette smoke and alcohol.
- MARTINI, D.Z.; MACK, J.M.; LINARES, C.E.B.; BOLZAN, R.C. (2010) Efeito da exposição à fumaça do cigarro sobre parâmetros comportamentais e peroxidação lipídica em camundongos.
- MATT, G.E.; QUINTANA, P.J.E.; ZAKARIAN, J.M.; FORTMANN, A.L.; CHATFIELD, D.A.; HOH, E.; URIBE, A.M.; HOVELL, M.F. When smokers move out and non-smokers move in: residential thirdhand smoke pollution and exposure. *Tobacco control*, v.20, n.1, p.e1-e8, 2011.
- MEDEIROS, A.C.; ROCHA, K.F.B.; DANTAS FILHO, A.M.; AIRES NETO, T.; AZEVEDO, I.M. (2003) Lesões pulmonares provocadas pela nicotina por via subcutânea em ratos.

- MELLO, P.R.; OKAY, T.S.; DORES, E.F.G.C.; BOTELHO C, (2005). Avaliação de um sistema de exposição tabágica passiva em modelo experimental utilizando cotinina e carboxiemoglobina como marcadores de exposição. Pulmão RJ, v.14, n.3, p.228-236.
- MORRIS, R.G.M.; GARRUD, P.; RAWLINS, J.N.P.; O'KEEFE, J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature 297, pg. 681-683.
- NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH – DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. USA. Review and evolution of smoking cessation methods. Washington, 1987.
- PELLOW, S.; FILE, S.E. (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat.
- PETER A. CROOKS, LINDA P. DWOSKIN, (1997) Contribution of CNS nicotine metabolites to the neuropharmacological effects of nicotine and tobacco smoking.
- PICKWORTH, W.B.; BUNKER, E.B.; HENNINGFIELD, J.E. (1994) Transdermal nicotine: reduction of smoking with minimal abuse liability. Psychopharmacological 115, pg. 9-14.
- POMERLEAU C.S.; POMERLEAU O.F., (1992) Euphoriant effects of nicotine in smokers. Psychopharmacology 108: 460-465.
- PROCKOP, L.D.; CHICHKOVA, R.I, (2007). Carbon monoxide intoxication: an updated review- Journal of the neurological sciences.
- RAMACHANDRAN, S.; XIE, L.; SCOTT, J.A.; SUBRAMANIAM, S.; LAL, R. (2007) A novel role for connexin hemi channel in oxidative stress and smoking-induced cell injury.
- RAMOS, A. & MORMÈDE, P. (2007) Neurobehavioral genetics, methods, and applications. Ed. Taylor & Francis, pg.291-299.
- REZVANI, A.H.; LEVIN, E.D. (2000) Cognitive effects of nicotine. Biological Psychiatry,

vol. 49, pg 258-267.

- RIVERA OBALLE, H. J. et al. (2014). Effects of alcohol and/or tobacco exposure on spontaneous alveolar bone loss in rats: UFRGS.
- ROBERTSON, C. R., RICHARD, H. D, (1998) Health law and ethics. Prying open the door to the tobacco industry's secret about nicotine: The Minnesota tobacco trial. JAMA. 280:1173.
- ROSE, J.E.; BEHM, F.M.; LEVIN, E.D. (1993) Role of nicotine dose and sensory cues in the regulation of smoke intake. Pharmacological Biochemical Behavior, 44, pg. 891-900.
- ROSEMBERG, J. (1981) Tabagismo, sério problema de saúde pública. São Paulo, ALMED/ EDUSP, 370p.
- SEMENZATI, Graziela de Oliveira. (2012) Estudo histológico e imunohistoquímico das proteínas P53 e Ki-67 nas mucosas da língua, faringe e laringe de ratos expostos à inalação da fumaça de cigarro. 2012. 109 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu.
- SILVA, C.P.; VOIGT, C.L.; CAMPOS, S.X. (2014) Determinação de íons metálicos em cigarros contrabandeados no Brasil. Revista Virtual de Química, vol.6, n5.
- SILVA, Patrícia Ebersbach. Efeito do tabagismo passivo e do exercício físico associado sobre a expressão de transportador de glicose GLUT4 em músculos de ratos.(2009) 92 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade Ciências e Tecnologia.
- SILVA-FILHO, J.H.: O teste de campo aberto: exercício didático de psicologia experimental.
- SPECTOR, R., GOLBERG, M. J. (1982) Active transport of nicotine by choroid plexus in vitro. J Neuro Chemest. 38:594.
- STOHR, T., et al. (1997) Rat strain differences in open-field behavior and the locomotor stimulating and rewarding effects of amphetamine.

- SYLVERS, P.; LILIENFELD, S.O.; LAPRAIRIE, J.L. (2011) Differences between trait fear and trait anxiety: implications for psychopathology. *Clin. Psychol. Rev.*, 31. Pg.122-137.
- TARANTINO, A.B.; (1982) *Doenças pulmonares*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- TIZABI, Y. et al. (2009) Effects of nicotine on depressive-like behavior and hippocampal volume of female WKY rats.
- TORRES-PACHECO, L.H.L., (2013) *Avaliação do desenvolvimento do sistema nervoso central de camundongos Balb/c expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal*. Tese (doutorado), USP.
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, (1993) *Respiratory health effects of passive smoking. Lung cancer and other disorders*. US Dept Health Human Services. NIH Publication nº 93.3605.
- VIANA, M.B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. (1994) The elevated T- maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav*, 49, pg.549-554.
- VIOLA, H.; MONCADA, D. (2007) Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. *J. Neurosci.* 27(28):7476-81.
- WINDEN, D.R.; BARTON, D.B.; BETTERIDGE, B.C.; BODINE, J.S.; JONES, C.M.; ROGERS, G.D.; CHAVARRIA, M.; WRIGHT, A.J.; JERGENSEN, Z.R.; JIMENEZ, F.R.; REYNOLDS, P.R. (2014) Antenatal exposure of maternal secondhand smoke (SHS) increases fetal lung expression of RAGE and induces RAGE-mediated pulmonary inflammation.
- YANG, J.; JIANG, L.N.; YUAN, Z.L.; ZHENG, Y.F.; WANG, L.; JI, M.; SHEN, Z.Q.; WANG, X.W.; MA, Q.; XI, Z.G.; LI, J.W. (2008) Impacts of passive smoking on learning and memory ability of mouse offsprings and intervention by antioxidants.

