

The effects of exposing rats to cigarette smoke on milk production and growth of offspring

Efeitos da exposição à fumaça do cigarro sobre a produção láctea e o crescimento de filhotes de ratas

Paulo R. B. Mello¹, Thelma S. Okay², Clovis Botelho³

Resumo

Objetivos: Analisar o efeito da exposição à fumaça do cigarro na gestação e lactação sobre a produção láctea de ratas, ganho ponderal e crescimento linear dos filhotes.

Métodos: Três grupos de ratas foram estudados na gestação e lactação: 15 ratas expostas à fumaça do cigarro mais fluxo de ar, 18 ratas manipuladas, isto é, expostas ao fluxo de ar comprimido e 18 ratas controle. Os filhotes foram medidos e pesados a cada 5 dias, do primeiro ao 15º dia. A produção láctea foi estimada pelos métodos de captação de leite em 1 hora e ganho ponderal dos filhotes.

Resultados: Os filhotes das ratas expostos à fumaça do cigarro apresentaram menor peso e comprimento ao nascer. Durante a lactação, os filhotes das ratas expostas à fumaça e das apenas manipuladas ganharam menos peso que o grupo controle. A produção láctea pelo método de captação de leite em 1 hora foi reduzida no grupo exposto à fumaça e, em menor proporção, nas ratas do grupo manipulado. Pelo método do ganho ponderal dos filhotes, a produção láctea reduziu-se igualmente nos grupos exposto à fumaça e manipulado, comparados ao grupo controle.

Conclusões: A exposição à fumaça do cigarro comprometeu o peso e o comprimento ao nascer, mas, durante a lactação, também a manipulação comprometeu o ganho de peso dos filhotes. A manipulação e, mais acentuadamente, a exposição ao tabaco prejudicaram a produção de leite.

J Pediatr (Rio J). 2007;83(3):267-273: Tabagismo, efeitos tóxicos, lactação, ganho de peso, ratos.

Abstract

Objectives: To analyze the effects of exposure to cigarette smoke during gestation and lactation on the milk production of rats and on the weight gain and linear growth of their offspring.

Methods: Three groups of female rats were studied during gestation and lactation: 15 rats were exposed to cigarette smoke and air flow, 18 rats were handled, i.e., exposed to compressed air flow, and 18 rats were used as controls. Newborn rats were measured and weighed every 5 days, from the first to the 15th day. Milk production was estimated by 1-hour milk extraction and weight gained by litters.

Results: The offspring of rats exposed to cigarette smoke weighed less and were shorter at birth. During lactation, the offspring of rats exposed to smoke and also of rats that had merely been handled gained less weight than the control group. Milk production gauged by the 1-hour extraction method was reduced in the group exposed to smoke and, to a lesser extent, also in the group that had been handled. Milk production estimated according to the pups' weight gain was reduced equally in the groups exposed to smoke and merely handled, when compared to the control group.

Conclusions: Exposure to cigarette smoke compromised the birth weight and birth length, but during lactation, handling also compromised weight gain of offspring. Handling and, to a greater extent, exposure to tobacco, were prejudicial to milk production.

J Pediatr (Rio J). 2007;83(3):267-273: Smoking, toxic effects, lactation, weight gain, rats.

1. Doutor. Professor, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT.
2. Professora livre-docente, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.
3. Professor titular, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, e Instituto de Saúde Coletiva, UFMT, Cuiabá, MT.

Artigo submetido em 14.09.06, aceito em 26.02.07.

Como citar este artigo: Mello PR, Okay TS, Botelho C. The effects of exposing rats to cigarette smoke on milk production and growth of offspring. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(3):267-273.

doi 10.2223/JPED.1620

Introdução

O tabagismo pode afetar diferentes fases da reprodução humana, inclusive a lactação¹. Filhos de mães fumantes ganham peso numa velocidade menor que filhos de não-fumantes, sugerindo que o tabagismo possa afetar a produção de leite². Estudos da produção diária de leite, entre 1 e 3 meses de lactação, mostraram produção diária de leite significativamente menor em mães fumantes. Ao medir o ganho de peso em um período de 14 dias, foi observado que os filhos de fumantes apresentavam ganho ponderal médio 40% menor que os filhos de não-fumantes³.

O tabagismo ativo materno tem sido relacionado à falha no aleitamento, reduzindo a produção de leite e a duração do aleitamento^{4,5}, tanto exclusivo quanto misto², sendo a diminuição do tempo de aleitamento proporcional à intensidade do tabagismo materno⁶⁻⁸.

Embora os efeitos nocivos do tabagismo ativo sejam reconhecidos em diferentes fases do processo reprodutivo feminino, cada vez mais estudos fazem referência a efeitos semelhantes do tabagismo passivo. O risco relativo (RR) de uma mãe exposta ao tabagismo passivo ter uma criança de baixo peso ao nascimento foi de 2,17 (IC95% 1,05-4,50) quando comparada a mães que não tiveram nenhum contato com cigarro⁹. Dentre os expostos de maneira passiva, aqueles que apresentam maior risco parecem ser os fetos¹⁰, recém-nascidos e lactentes jovens¹¹.

Muito embora estudos experimentais tenham analisado o efeito do tabagismo sobre a lactação¹², existem divergências nos resultados obtidos. Tendo como hipótese que o tabagismo influencia o ganho ponderal e o crescimento pós-natal dos filhotes, este estudo experimental desenvolvido em ratas teve como objetivos analisar o efeito da fumaça do cigarro na produção láctea de ratas, no ganho ponderal e no crescimento linear de seus filhotes.

Métodos

Este estudo utilizou modelo experimental de exposição à fumaça do tabaco desenvolvido em ratas nas quais vários parâmetros foram analisados¹³, incluindo crescimento linear, ganho ponderal dos filhotes e produção láctea.

O cálculo amostral tomou como nível de significância 5% ($p < 0,05$) e erro beta de 0,1. Foi utilizada a fórmula $N = [(z_a - z_b) \text{ teta}]^2 / \text{delta}$, onde z_a e z_b representam os escores z de uma curva normal associada aos valores de alfa e beta, sendo teta o desvio padrão e delta a diferença considerada significativa, determinando um número mínimo de 15 animais por grupo.

Foram estudadas 51 ratas virgens de 4 meses de idade (*Ratus norvegicus*) da cepa Wistar fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso, mantidas em temperatura controlada (22 ± 2 °C), umidade de 40 a 60% e ciclo de luz/escuridão de 12 horas cada. Foram aceitos ani-

mais com peso entre 230 e 260 g, alimentados com ração Nuvilab (Nuvital, Curitiba, PR) e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em três grupos:

- Grupo F: animais expostos à fumaça de cigarro, sob fluxo de ar comprimido, durante 15 min duas vezes ao dia, durante a gestação e a lactação ($n = 15$);
- Grupo Ar: animais manipulados expostos a fluxo de ar comprimido, durante 15 min duas vezes ao dia, durante a gestação e a lactação ($n = 18$);
- Grupo C (controle): animais que não sofreram manipulação, exceto aquelas necessárias à pesagem ($n = 18$).

Foram utilizados, para os animais do grupo F, cigarros da marca Marlboro® (Philip Morris), cada cigarro contendo 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono (aferição por amostragem, Laboratório Labstat do Canadá).

O sistema de exposição utilizado e a avaliação da funcionalidade do sistema e dos marcadores de exposição utilizados – cotinina e carboxiemoglobina – foram anteriormente descritos^{14,15}. Consistiu de duas câmaras de madeira separadas por uma parede fenestrada. Na primeira câmara (de combustão), os cigarros eram queimados de forma passiva e, na segunda câmara (de inalação), eram colocados os animais. Durante a exposição, um fluxo de ar comprimido alimentava a combustão e dirigia o fluxo da fumaça para a câmara de inalação e daí para uma saída externa.

Os animais dos grupos F e Ar foram submetidos a inalação por 15 min, duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas, uma vez confirmada a gestação pelo esfregaço vaginal até o 17º dia de lactação. Durante a exposição, os animais do grupo F inalaram fumaça de cigarros queimados completamente e ventilados por fluxo de ar comprimido (10 L/min). Foram utilizados 10 cigarros por dia (cinco cigarros por exposição), ou seja, dois cigarros/animal/dia. Os animais do grupo Ar utilizaram sistema de exposição exclusivo para este grupo, com fluxo de ar comprimido semelhante, na mesma frequência e duração e nos mesmos horários que o grupo F.

As ninhadas foram reduzidas para oito filhotes, eliminando-se os excedentes de maneira aleatória. Foi tolerada redução no decorrer do experimento para um mínimo de sete filhotes por ninhada. Os filhotes foram numerados entre 12 e 24 horas de vida, e novamente no 10º dia de vida. O peso e o comprimento linear (medida nariz-extremidade da cauda do filhote estendido sobre uma superfície plana) foram obtidos de acordo com protocolo de Silva et al.¹⁴. O peso e o comprimento dos filhotes foram medidos no primeiro, quinto, 10º e 15º dias de vida, sempre nos mesmos horários, e o peso foi obtido isoladamente na manhã do 12º dia de vida. O ganho de peso na lactação foi medido pelo peso acumulado ou pela diferença entre o peso ao nascimento e o peso aferido no dias de vida referidos.

A produção láctea foi avaliada segundo Morag¹⁶ e Sampson & Jansen¹⁷. Segundo Morag¹⁶, obteve-se a diferença de peso dos filhotes pré e pós-mamada (medida da captação de leite). No 12º dia de lactação, os filhotes foram separados de suas mães por 12 horas e, ao final deste período, foram pesados (peso inicial). A seguir e imediatamente após a exposição materna (grupos F e Ar), foram colocados para mamar por 1 hora e novamente pesados (peso final). A produção láctea em g/criança foi representada pela média de ganho de peso em 1 hora de todos os filhotes da ninhada.

De acordo com Sampson & Jansen¹⁷, foi estudado o período compreendido entre o quinto e o 12º dia após o parto aplicando-se a seguinte equação: produção láctea (g/criança/dia) = 0,0332 + 0,667 (peso) + 0,877 (ganho de peso), na qual o peso é igual ao peso do último dia do período e o ganho de peso é igual à diferença entre o peso inicial e o peso no final do período.

A tabulação dos dados foi feita no programa Excel, e as análises estatísticas com o programa SPSS versão 9.0. O teste de Lavene foi utilizado para verificação do comportamento das variáveis numéricas. Para análises paramétricas, utilizou-se ANOVA e teste t de Student, conforme o caso. O nível de significância adotado foi p < 0,05.

O projeto de pesquisa foi aprovado pela comissão de ética para análise de projetos de pesquisa (CAPPesq) da diretoria

clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob nº 777/01 em 25/10/2001.

Resultados

Os valores de peso dos filhotes do nascimento até o 15º dia de vida encontram-se na Tabela 1. Observou-se que os filhotes de ratas do grupo F apresentam menor peso ao nascimento em relação aos animais controle, e que essa diferença se manteve durante toda a lactação. Os filhotes do grupo Ar nasceram com peso maior que os filhotes do grupo F, mas essa diferença não é mais significativa a partir do 10º dia de lactação. No 15º dia de lactação, os animais do grupo Ar têm filhotes com peso comparável ao grupo F e com peso inferior ao grupo controle.

O comprimento dos filhotes do grupo F foi menor que os animais do grupo C ao nascer e ao longo da lactação (Tabela 2). Os filhotes de ratas do grupo Ar nascem com comprimento linear maior que os filhotes do grupo F, porém esta diferença não é mais significativa a partir do 10º dia de lactação. Comparando os dois grupos não expostos à fumaça de cigarros (ar comprimido e controle), não foi observada diferença no comprimento linear dos filhotes em nenhum dos tempos estudados.

A comparação do peso acumulado dos filhotes ao longo dos 15 primeiros dias de vida mostra que o ganho ponderal foi

Tabela 1 - Médias de peso (g) e desvio padrão ao nascer, no quinto, 10º e 15º dias de vida de filhotes de ratas expostas à fumaça do cigarro e ao ar comprimido, comparadas aos controles

	n	Nascimento	5º dia	10º dia	15º dia
Grupo					
F	15	5,50 (0,28)	9,46 (0,76)	17,57 (1,19)	22,42 (1,86)
Ar	18	5,89 (0,47)	10,45 (1,06)	18,19 (1,51)	22,93 (1,87)
C	18	5,87 (0,36)	10,62 (1,16)	19,23 (1,99)	24,73 (2,45)
Teste					
ANOVA		p < 0,01	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,01
Teste t					
C x F		p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
C x Ar		NS	NS	NS	p < 0,01
F x Ar		p < 0,01	p < 0,01	NS	NS

Ar = ar comprimido; C = controles; F = cigarro; NS = não-significante.

maior no grupo controle em relação ao grupo F ao longo do período de lactação estudado. Já os filhotes do grupo Ar ganharam peso de forma semelhante aos filhotes do grupo controle no início da lactação. No entanto, este ganho diminuiu de forma significativa ao longo da lactação, o que foi detectado no 15º dia de vida e fez com que, na comparação com o grupo F, o grupo Ar não tenha mostrado diferenças quanto ao ganho de peso durante a lactação. F = 16,91 g ($\pm 1,91$); Ar = 17,26 g ($\pm 2,09$); C = 18,81 g ($\pm 2,26$) (F versus C; $p < 0,05$).

A produção láctea (Figura 1) avaliada no 12º dia de lactação, segundo Morag⁹, mostrou que a captação de leite dos filhotes do grupo F foi menor que a dos filhotes dos outros dois grupos; entre estes últimos, os filhotes do grupo Ar captaram menos leite que os controles. (Figura 1, gráfico superior).

A produção láctea avaliada entre o quinto e o 12º dia de lactação, segundo Sampson & Jansen¹⁷, mostrou que as ratas dos grupos expostos ao cigarro e ao ar comprimido não apresentaram diferença de produção láctea entre si, e que estes dois grupos produziram menos leite que as ratas do grupo controle. (Figura 1, gráfico inferior).

Discussão

A avaliação do ganho ponderal e do comprimento dos filhotes ao longo da lactação mostrou que a diferença de peso dos filhotes entre os grupos expostos à fumaça do cigarro e o

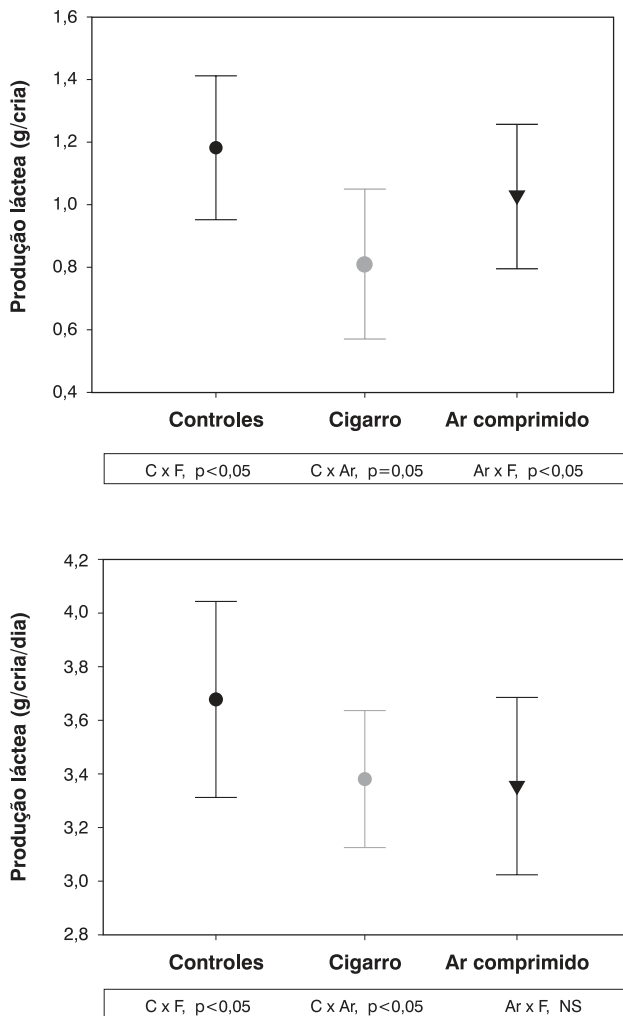
controle persistiu, mesmo quando se descontou o peso de nascimento do ganho ponderal por meio de análise do ganho de peso acumulado. Quando se comparou o ganho de peso acumulado ao longo da lactação entre os grupos exposto à fumaça do cigarro e ar comprimido, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias. Esses dados sugerem que, quando se procurou retirar o efeito da manipulação (exposição dos animais ao fluxo de ar comprimido), o prejuízo da perda ponderal observada ao nascimento no grupo de filhotes de mães fumantes desaparece na lactação.

Neste estudo, o ganho ponderal da prole foi avaliado em filhotes de ratas expostas ao tabaco durante toda a gestação e praticamente todo o período de lactação, procurando mimetizar a condição de tabagismo humano. Como não foi estudado isoladamente cada um destes períodos reprodutivos, os efeitos observados na lactação podem refletir alterações maternas e fetais decorrentes da exposição que ocorreu na gestação. Sabe-se que a nicotina interfere no acúmulo lipídico na gestação, podendo reduzir a capacidade da mãe de suprir as demandas energéticas próprias da lactação, particularmente quando a ingestão alimentar for restrita¹⁸. Da mesma forma, a ingestão materna analisada sob forma qualitativa e quantitativa é de grande importância no período de

Tabela 2 - Valores médios (cm) e desvio padrão do comprimento ao nascer, no quinto, 10º e 15º dias de vida de filhotes de ratas expostas à fumaça do cigarro e ao ar comprimido, comparados aos controles

	n	Nascimento	5º dia	10º dia	15º dia
Grupo					
F	15	6,78 (0,28)	8,80 (0,76)	11,60 (1,19)	13,96 (1,86)
Ar	18	6,94 (0,18)	9,26 (0,38)	11,83 (0,38)	14,20 (0,51)
C	18	6,92 (0,11)	9,20 (0,32)	11,94 (0,45)	14,49 (0,61)
Teste					
ANOVA		$p < 0,05$	$p < 0,05$	NS	$p < 0,05$
Teste t					
C x F		$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
C x Ar		NS	NS	NS	NS
F x Ar		$p < 0,05$	$p < 0,05$	NS	NS

Ar = ar comprimido; C = controles; F = cigarro; NS = não-significante.



Ar = ar comprimido; C = controles; F = cigarro; NS = não-significante.

Figura 1 - Valores médios e desvios padrão de produção láctea em g/criança pelo método de captação de leite em 1 hora (gráfico superior) e em g/criança/dia (Sampson & Jansen, 1984) medida entre o quinto e o 12º dia de lactação (gráfico inferior), de ratas expostas à fumaça do cigarro e ao ar comprimido, comparadas aos controles

lactação, tanto para a saúde da mãe quanto para o seu sucesso na lactação, além de ser essencial ao crescimento dos filhotes¹⁹.

Filhotes de ratas que receberam injeções de nicotina na gestação e na lactação apresentaram prejuízo no ganho ponderal e no crescimento linear no final da primeira metade da lactação²⁰. Por outro lado, filhotes de ratas que receberam nicotina na gestação e não na lactação apresentaram redução de peso ao nascimento, mas sem diferença significativa de peso ao desmame com 21 dias²¹.

Estudos em humanos mostraram que, embora o tabagismo durante a gestação esteja associado com recém-nascidos de peso mais baixo no momento do parto, depois do nascimento estas crianças tendem a alcançar a curva de crescimento ideal²². Aparentemente, a ação do tabagismo esta-

ria mais associada à exposição intra-útero do que à exposição pós-natal (tabagismo passivo) durante o início da infância²³.

Os dados aqui analisados mostram que os animais expostos ao ar comprimido nascem com peso semelhante aos controles. Todavia, ao longo da lactação ganham menos peso em relação aos controles, de forma semelhante aos filhotes do grupo exposto à fumaça de cigarros. Assim, tem-se a hipótese de que o menor ganho ponderal corrigido, nos dois grupos de animais expostos em relação aos animais não manipulados (controles), não seja devido a eventos gestacionais, e sim a fatores que agem no período de lactação, tais como o estresse.

Os valores médios de captação de leite obtidos para os animais do grupo controle foram de 1,18 g/criança, superiores aos relatados por Morag¹⁶, que foram de 0,9 g/criança, porém inferiores aos descritos por Lau²⁴, que foram de 1,35 g/criança. Esses valores, 15% mais elevados, poderiam ser justificados por diferenças de linhagem animal, dieta e acomodação. Ao comparar os resultados nos três grupos analisados, observou-se que os filhotes do grupo controle captaram volume maior de leite em relação aos do grupo ar comprimido, e estes captaram volumes maiores de leite que os filhotes do grupo exposto à fumaça do cigarro. Por este método, embora a produção láctea nos grupos expostos à fumaça do cigarro e ar comprimido tenha sido menor que a do grupo controle, ela foi maior no grupo manipulado exclusivamente com ar comprimido em relação aos expostos à fumaça de cigarros.

Analisando a produção láctea pelo método proposto por Sampson & Jansen¹⁷, foi observado que as ratas dos grupos F e Ar produziram menos leite que aquelas do grupo controle e não apresentaram diferenças entre si. Grigor²⁵ estimou a produção láctea indiretamente por meio da soma do ganho de peso dos animais nas 24 horas, descontadas as perdas insensíveis estimadas pela perda ponderal de outros filhotes em igual período de jejum. Seus resultados mostraram valores de produção láctea que foram de 46 g ao dia em ninhadas reduzidas para 10 filhotes. Já aplicando a mesma equação descrita por Sampson & Jansen¹⁷, Grigor²⁵ encontrou uma estimativa de produção láctea 10% menor. Esses valores são semelhantes aos encontrados no presente estudo, que foram medidos pela mesma equação, porém corrigidos para uma ninhada reduzida para oito filhotes.

Sabe-se que o método proposto por Sampson & Jansen¹⁷ é uma medida indireta de produção láctea, estimada a partir do ganho médio de peso diário da ninhada. O cálculo leva em consideração a interferência provocada pelas perdas insensíveis (perspiração e excreções) e consideram constante o ganho de peso entre o quinto e o 15º dias de vida.

Embora o ganho de peso de uma ninhada padronizada possa ser usado como índice qualitativo da produção láctea,

não pode ser usado para medir, de forma acurada, a produção de leite, visto que não são levados em consideração os requerimentos de manutenção da ninhada, nem possíveis variações no suprimento de nutrientes que possam resultar de alterações na composição do leite¹⁹.

A comparação dos resultados das diferenças das duas medidas de produção láctea mostrou que, enquanto a medida feita ao longo da lactação não evidenciou diferenças entre o grupo exposto à fumaça do cigarro e ar comprimido, a medida realizada pelo método de Morag¹⁶ mostrou efeito independente do cigarro. Como esta medida reflete a produção de leite das últimas 12 horas, a produção láctea durante o período de afastamento dos filhotes poderia ter sido influenciada pelas duas exposições ocorridas neste intervalo. Contudo, na medida de longo prazo não foi observada diferença entre os grupos F e Ar, o que sugere que os animais expostos ao tabaco tenham mantido a produção de leite no intervalo das exposições ao cigarro. Este achado está, em parte, de acordo com os resultados da avaliação hormonal, na qual os animais expostos à fumaça do cigarro não mostraram diferenças na liberação de prolactina¹³. Portanto, o menor ganho de peso dos filhotes do grupo fumante em 1 hora de sucção pode ser justificado por redução da ejeção de leite pelo animal.

É conhecido que a ejeção de leite pode estar comprometida devido a estímulos que causem estresse. A liberação de leite diminuiu em ratas submetidas a estímulos visuais, olfatórios, auditivos ou restrição física²⁶. Os mecanismos envolvidos seriam decorrentes de ativação do sistema simpático adrenal periférico e redução do número de pulsos de oxitocina. A ativação simpática causa vasoconstricção nas glândulas mamárias dificultando o acesso da oxitocina à célula mioepitelial, provocando aumento do tônus ductal mamário e influenciando a dinâmica das pressões intramamárias^{27,28}. Além disso, deste processo de estimulação simpática, participa um componente cerebral que inibe o estímulo oxitócico responsável pela ejeção de leite²⁹.

Contudo, o efeito do estresse na lactação é complexo. Dependendo da duração do estresse e do(s) seu(s) sítio(s) de ação, a supressão da lactação pode resultar de uma diminuição da síntese ou ejeção do leite. O tempo de ocorrência dos efeitos observados pode variar, se o estresse ocorre de forma aguda ou prolongada, sobre a ação da prolactina – síntese ou sobre a ação da oxitocina – ejeção de leite³⁰.

Contrariamente aos resultados obtidos na lactação, os grupos de animais não expostos à fumaça do cigarro não diferiram entre si quanto ao peso de nascimento, denotando um efeito exclusivo da exposição tabágica ao longo da gestação. Contudo, os dados ponderais e de produção láctea sugerem que o efeito do estresse animal decorrente da manipulação experimental sobre a lactação foi semelhante ao da exposição tabágica adotada, e que o efeito observado

do cigarro sobre a captação de leite possa ser superado pelos filhotes nos intervalos das exposições. Para o modelo adotado, a lactação mostrou-se sensível ao estresse animal, ao contrário da gestação, que se mostrou sensível apenas aos efeitos da exposição à fumaça de cigarros.

Neste estudo, a exposição à fumaça do cigarro reduziu o peso e o comprimento ao nascer. Este efeito foi independente, atribuível ao tabaco. Durante a lactação, as ratas do grupo exposto à fumaça do tabaco produziram menor volume de leite, seus filhotes captaram menos leite e apresentaram menor ganho ponderal e menor crescimento linear pós-natal em relação ao grupo controle. Durante a lactação, a manipulação pela exposição ao ar comprimido comprometeu o ganho de peso dos filhotes. A captação de leite foi prejudicada pela manipulação e, mais acentuadamente, pela exposição à fumaça do cigarro, mas ao longo da lactação, o efeito redutor da fumaça do cigarro sobre a produção de leite não diferiu da manipulação.

Referências

1. Mello PR, Pinto GR, Botelho C. [Influência do tabagismo na fertilidade, gestação e lactação](#). *J Pediatr (Rio J)*. 2001;77:257-64.
2. Cabello G, Hrepic N, Astudillo I, Benitez R, Ortega L, Poblete S, et al. [Hábito de fumar y su relacion con el embarazo y la lactancia en Arica \(Chile\)](#). *Rev Chil Pediatr*. 1991;62:386-9.
3. Vio F, Salazar G, Infante C. [Smoking during pregnancy and lactation and its effects on breast-milk volume](#). *Am J Clin Nutr*. 1991;54:1011-6.
4. Horta BL, Kramer MS, Platt RW. [Maternal smoking and the risk of early weaning: a meta-analysis](#). *Am J Public Health*. 2001;91:304-7.
5. Letson GW, Rosenberg KD, Wu L. [Association between smoking during pregnancy and breastfeeding at about 2 weeks of age](#). *J Hum Lact*. 2002;18:368-72.
6. Nafstad P, Jaakkola JJ, Hagen JA, Pedersen BS, Qvigstad E, Botten G, et al. [Weight gain during the first year of life in relation to maternal smoking and breast feeding in Norway](#). *J Epidemiol Community Health*. 1997;51:261-5.
7. Horta BL, Victora CG, Menezes AM, Barros FC. [Environmental tobacco smoke and breastfeeding duration](#). *Am J Epidemiol*. 1997;146:128-33.
8. Haug K, Irgens LM, Baste V, Markestad T, Skjaerven R, Schreuder P. [Secular trends in breastfeeding and parental smoking](#). *Acta Paediatr*. 1998;87:1023-7.
9. Martin TR, Bracken MB. [Association of low birth weight with passive smoke exposure in pregnancy](#). *Am J Epidemiol*. 1986;124:633-42.
10. Dejmeck J, Solansky I, Podrázilova K, Sram RJ. [The exposure of nonsmoking and smoking mothers to environmental tobacco smoke during different gestational phases and fetal growth](#). *Environ Health Perspect*. 2002;110:601-6.
11. Witschi H, Joad JP, Pinkerton KE. [The toxicology of environmental tobacco smoke](#). *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:29-52.
12. Amir LH. [Maternal smoking and reduced duration of breastfeeding: a review of possible mechanisms](#). *Early Hum Dev*. 2001;64:45-76.

13. Mello PRB. Efeito do tabagismo sobre a liberação de prolactina, produção láctea e componentes imunes do leite de ratas [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004. Disponível: <http://www.capes.gov.br/capesdw/resumo.html?idtese=200426533002010072P0.ratos>. Access: 20/12/2006.
14. Gonçalves-Silva RMV, Lemos-Santos MG, Botelho C. **Influência do tabagismo no ganho ponderal, crescimento corporal, consumo alimentar e hídrico de ratos.** J Pneumol. 1997;23:124-30.
15. Mello PRB, Okay TS, Dores EFG, Botelho C. Avaliação de um sistema de exposição tabágica passiva em modelo experimental utilizando cotinina e carboxiemoglobina como marcadores de exposição. Pulmao RJ. 2005;14:228-36.
16. Morag M. **Estimation of milk yield in the rat.** Lab Anim. 1970;4:259-72.
17. Sampson DA, Jansen GR. **Measurement of milk yield in the lactating rat from pup weight and weight gain.** J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1984;3:613-7.
18. Williams CM, Kanagasabai T. **Maternal adipose tissue response to nicotine administration in the pregnant rat: effects on fetal body fat and cellularity.** Br J Nutr. 1984;51:7-13.
19. Leite MS, Azeredo VB, Carmo MGT, Boaventura GT. **Utilização da multimistura durante a lactação e seus efeitos na produção e composição do leite materno de ratas.** Rev Nutr. 2002;15:211-21.
20. Hamosh M, Simon MR, Hamosh P. **Effect of nicotine on the development of fetal and suckling rats.** Biol Neonate. 1979;35:290-7.
21. Becker RF, Little CR, King JE. **Experimental studies on nicotine absorption in rats during pregnancy. 3. Effect of subcutaneous injection of small chronic doses upon mother, fetus, and neonate.** Am J Obstet Gynecol. 1968;100:957-68.
22. Boshuizen HC, Verkerk PH, Reerink JD, Herngreen WP, Zaadstra BM, Verloove-Vanhorik SP. **Maternal smoking during lactation: relation to growth during the first year of life in a Dutch birth cohort.** Am J Epidemiol. 1998;15:117-26.
23. Eskenazi B, Bergmann JJ. **Passive and active maternal smoking during pregnancy, as measured by serum cotinine, and postnatal smoke exposure. I. Effects on physical growth at age 5 years.** Am J Epidemiol. 1995;142(9 Suppl):S10-8.
24. Lau C, Henning SJ. **Regulation of milk ingestion in the infant rat.** Physiol Behav. 1984;33:809-15.
25. Grigor MR, Allan JE, Carrington JM, Carne A, Geursen A, Young D, et al. **Effect of dietary protein and food restriction on milk production and composition, maternal tissues and enzymes in lactating rats.** J Nutr. 1987;117:1247-58.
26. Lau C. **Effects of various stressors on milk release in the rat.** Physiol Behav. 1992;51:1157-63.
27. Findlay ALR, Grosvenor CE. **The role of mammary gland innervation in the control of the motor apparatus of the mammary gland: a review.** Dairy Sci Abstr. 1969;31:109-16.
28. Wakerley JB, Clarke G, Summerlee AJS. **Milk ejection and its control.** In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction.* 2nd ed. New York: Raven; 1994. p. 1131-77.
29. Neville MC. **Anatomy and physiology of lactation.** Ped Clin North Am. 2001;48:13-34.
30. Lau C. **Effects of stress on lactation.** Ped Clin North Am. 2001;48:221-34.

Correspondência:

Paulo Roberto Bezerra de Mello
Rua Arnaldo de Matos 277/18, Goiabeiras
CEP 78020-825 – Cuiabá, MT
Tel.: (65) 3051.3591
Fax: (65) 3623.1334
E-mail: prbmello@uol.com.br