



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Cintia Rodrigues Pinheiro

**Efeitos da exposição à nicotina e à fumaça de cigarro durante a lactação
sobre o sistema o sistema de recompensa cerebral em ratos**

Rio de Janeiro

2015

Cintia Rodrigues Pinheiro

Efeitos da exposição à nicotina e à fumaça de cigarro durante a lactação sobre o sistema de recompensa cerebral em ratos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisboa

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P654 Pinheiro, Cintia Rodrigues.
Efeitos da exposição à nicotina e à fumaça de cigarro durante a lactação sobre o sistema de recompensa cerebral em ratos / Cintia Rodrigues Pinheiro. – 2015.
91 f.

Orientadora: Patrícia Cristina Lisboa.

Coorientadora: Elaine de Oliveira.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Nicotina - Teses. 2. Tabaco - Efeitos adversos. 3. Fenômenos Fisiológicos da Nutrição do Lactente. 4. Aleitamento Materno - Efeitos adversos. 5. Reforço por Recompensa. 6. Leptina - Teses. I. Lisboa, Patrícia Cristina. II. Oliveira, Elaine de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 613.842: 616-053.3

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Cintia Rodrigues Pinheiro

Efeitos da exposição à nicotina e à fumaça de cigarro durante a lactação sobre o sistema de recompensa cerebral em ratos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 13 de março de 2015.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Patricia Cristina Lisboa (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Claudio Carneiro Filgueiras
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof Dr. Aldo Bolten Lucion
Universidade de São Paulo

Prof.^a Dra. Patricia Pelufo Silveira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

À minha mãe, meu pai e a minha vizinha amada que infelizmente já não está com a gente, por todo apoio, incentivo, compreensão e paciência.

AGRADECIMENTOS

À Patrícia Lisboa por ter me aceitado como aluna lá em 2006 e por ter me orientado em todo o meu estudo científico. Graças a você, este ano completo nove anos de LFE e posso dizer com certeza que todo amadurecimento pessoal e científico conquistado até hoje, em parte eu devo a você e a toda equipe do LFE. Fazer parte dessa equipe tão dedicada à pesquisa me enche de orgulho.

Ao professor Egberto Gaspar de Moura, por todas as ideias, dedicação e incentivo. Seja em seminários ou em conversas informais, a sua presença sempre nos traz conhecimento. Gosto de dizer que você sempre dá aquele toque especial nos artigos e projetos. Em analogia, é como se colocasse aquela cereja que faltava no bolo.

À minha co-orientadora Elaine de Oliveira pela paciência, amizade, dedicação e por me ajudar sempre, em tudo que eu precisava. Tudo mesmo, até ficar um dia todo rodando de carro para pegar ratos em outros laboratórios. Lembra? Rsrs.

À Isis Hara Trevenzoli pelos ensinamentos com muita paciência lá na iniciação científica. Sua tranquilidade e perfeição na bancada me encantam e me inspiram muito.

À Ana Paula Santos da Silva pela amizade e por ter me ajudado nos trabalhos de bancada e biotério. Nós somos a equipe NIC/fumaça e também aquele biscoito traquinas metade preto e metade branco. Foi muito, muito agradável ter trabalhado com você.

À Natália Lima pela amizade e companhia na bancada. Eu, você e Ana éramos do bonde se...Mas nos divertíamos muito.

Às amigas Jéssica Nobre, Fernanda Quitete, Janaine Cavalcanti, Nayara Peixoto, Lígia Maia e Juliana Franco pela amizade muito além do trabalho.

À aluna de pós-graduação Bruna Lotufo e pós-doutorado Viviane Rapozo pela ajuda mais que indispensável para a realização dos punches. Sem vocês eu continuaria a ver orelhinha do Mickey, coraçãozinho e bigodinho.

Aos alunos de pós-graduação Ellen Conceição e Sylvio Claudio-Neto, À pós-doutoranda Mabel Fraga e aos alunos de iniciação científica Alan Vicente, Aline Fernandes, Bruna Aragão, Vanessa Tavares e Mariana Maciel que contribuíram em algum momento para o desenvolvimento desta tese e em especial Andressa Guimarães que acompanhou mais de perto os experimentos de bancada e análise dos dados.

Ao bioterista Ulisses pelo cuidado com os animais.

À minha família, e todos os amigos por ter apoiado e acompanhado todas as minhas decisões.

Ao meu namorado Lucas, por sempre me apoiar e entender os fins de semana que eu precisava estar no LFE ou trabalhando os dados em casa. Ter realizado o doutorado em sua companhia foi muito confortante. Obrigada por todo o carinho.

E por fim, agradeço sempre aos animais do laboratório que doaram suas vidas mesmo que involuntariamente para o desenvolvimento e avanço científico. Eles foram indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

PINHEIRO, Cintia Rodrigues. *Efeitos da exposição à nicotina e à fumaça de cigarro durante a lactação sobre o sistema de recompensa cerebral em ratos*. 91 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Crianças de mães fumantes são mais suscetíveis a se tornarem adultos obesos e se viciarem em drogas ou alimentos palatáveis. Drogas e alimentos ativam a via mesolímbica de recompensa, causando sensação de prazer que induz ainda mais o consumo. Assim, avaliamos a relação entre a exposição apenas à nicotina ou à fumaça do cigarro durante a lactação com a preferência alimentar e sistema dopaminérgico de recompensa cerebral das proles, em dois modelos de programação: Modelo I: no 2o dia pós-natal (PN), lactantes receberam implante de minibombas osmóticas que liberam nicotina (NIC) ou salina (C), durante 14 dias. Em PN150 e novamente em PN160, as proles foram divididas em 4 grupos para um desafio alimentar: N-SC e C-SC que receberam ração padrão; N-SSD e C-SSD que podiam escolher livremente entre as dietas hiperlipídica e hiperglicídica. A ingestão alimentar foi avaliada após 12 h. As mães foram sacrificadas apenas na 21ª da lactação (desmame) e as proles em PN15 (com nicotina), PN21 e PN170 (ausência da NIC). Ao desmame, as ratas lactantes NIC apresentaram menor conteúdo de tirosina hidroxilase (TH), maior OBRb e SOCS3 na área tegmentar ventral (VTA); menor TH, maior receptor de dopamina 1 (D1R), receptor de dopamina 2 (D2R) e transportador de dopamina (DAT) no núcleo accumbens (NAc); maior conteúdo de TH no estriado dorsal (DS); e maior D2R e SOCS3 no núcleo arqueado (ARC). Em PN15, os filhotes NIC apresentaram maior conteúdo de D1R, D2R e menor DAT no NAc, enquanto em PN21, apresentaram apenas menor DAT no DS, e menor conteúdo de pSTAT3 em ARC. Aos 170 dias, as proles SSD demonstraram maior preferência para a ração hiperlipídica. No entanto, os animais N-SSD consumiram mais ração hiperglicídica do que as proles C-SSD. A prole N apresentou menor conteúdo de D2R e DAT no NAc e menor D2R no ARC. Modelo II: as mães e suas proles foram divididas em: expostos à fumaça do cigarro (grupo S: 4 vezes / dia, do 3º ao 21º dia de lactação), e expostos ao ar filtrado (grupo C). Em PN175, as proles foram divididas em 4 grupos para o desafio alimentar S-SC, C-SC, S-SSD e C-SSD. A ingestão alimentar foi avaliada após 30 min e 12 h. Em PN180, as proles foram sacrificadas. O grupo S-SSD ingeriu mais das rações palatáveis do que o grupo C-SSD em 30 min e 12 h. Ambos os grupos preferiram a ração hiperlipídica. No entanto, os animais S-SSD consumiram mais ração hiperlipídica do que C-SSD em 30 min. A prole S apresentou menor conteúdo de TH no VTA, menor conteúdo de TH, D2R e maior conteúdo de D1R no NAc e menor OBRb no ARC. Demonstramos que tanto a nicotina isolada como a exposição à fumaça do cigarro durante a lactação resultaram em mudanças no sistema dopaminérgico das proles, programando o comportamento alimentar devido à diminuição da dopamina no NAc.

Palavras-chave: Fumaça. Nicotina. Lactação. Sistema de recompensa cerebral. Preferência alimentar. Programação.

ABSTRACT

PINHEIRO, Cintia Rodrigues. *Effects of exposure to nicotine and cigarette smoke during lactation on the brain reward system in rats*. 2015. 91 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Children from smoking mothers are more susceptible to become obese adults and to become drug or food addicts. Drugs and food activate the mesolimbic reward pathway, causing a sense of pleasure that induces further consumption. Thus, we studied the relationship between only nicotine or tobacco smoke exposure during lactation with feeding behavior and brain dopaminergic reward system at adulthood, in two programming models: Model I, on the postnatal day (PN) 2, lactating rats were implanted with minipumps releasing nicotine (NIC) or saline (C) for 14 days. On PN150 and again on PN160, offspring were divided into 4 groups for a food challenge: N-SC and C-SC received standard chow; N-SSD and C-SSD could freely select between hyperlipidic and hyperglycemic diets. Mothers were euthanized only in 21^a of lactation and offspring were euthanized in PN15 (with nicotine), PN21 and PN170 (withdraw). At weaning (PN21), NIC dams had: lower tyrosine hydroxylase (TH), higher OBRb and SOCS3 contents in ventral tegmental area (VTA); lower TH, higher dopamine receptor 1 (D1R), dopamine receptor 2 (D2R) and dopamine transporter (DAT) contents in nucleus accumbens (NAc); higher TH content in dorsal striatum (DS); and higher D2R and SOCS3 contents in arcuate nucleus (ARC). On PN15, NIC pups had higher D1R, D2R and lower DAT contents in NAc, while on PN21 they had lower DAT in DS, and lower pSTAT3 content in ARC. On PN170, SSD animals showed an increased food intake compared with SC ones and a preference for the hyperlipidic chow. However, N-SSD animals consumed relatively more hyperglycemic chow than C-SSD ones. N offspring presented lower D2R and DAT contents in the NAc, and lower D2R in the ARC. Model II, nursing rats and their pups were divided into: tobacco smoke-exposed (S group: 4 times/day, from the 3rd to the 21th day of lactation), and ambient air-exposed (C group). On PN175, offspring were divided into 4 groups for a food challenge: S-SC and C-SC received standard chow; S-SSD and C-SSD could select between hyperlipidic and hyperglycemic diets. Food intake was recorded after 30 min and 12 h. On PN180, offspring were euthanized. SSD animals presented a higher food intake compared with SC ones. S-SSD animals ate more than C-SSD ones at 30 min and 12 h. Both groups preferred the hyperlipidic chow. However, S-SSD animals consumed relatively more hyperlipidic chow than C-SSD at 30 min. S animals presented lower TH content in the ventral tegmental area, lower TH, D2R, higher D1R contents in the NAc and lower OBRb in the ARC. We showed that both nicotine alone as well as cigarette smoke exposure during the lactation resulted in changes in the dopaminergic system of the offspring, programming the eating behavior due to decreased dopamine in the NAc.

Keywords: Smoke. Nicotine. Lactation. Brain reward system. Food preference. Programming

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Efeito da exposição à nicotina em ratas lactantes sobre o conteúdo das proteínas TH, OBRb, pJAK2, pSTAT3 e SOCS3 na area tegmentar ventral (VTA).....	36
Figura 2 –	Efeito da exposição à nicotina em ratas lactantes sobre o conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT, receptor μ opioide no núcleo accumbens (NAc).....	37
Figura 3 –	Efeito da exposição à nicotina em ratas lactantes sobre o conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT, receptor μ opioide no estriado dorsal (DS).....	38
Figura 4 –	Efeito da exposição à nicotina em ratas lactantes sobre o conteúdo das proteínas D2R, OBRb, pJAK2, pSTAT3, SOCS3, NPY e POMC no núcleo arqueado (ARC).....	39
Figura 5 –	Efeito da exposição neonatal à nicotina nas proles aos 15 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT e receptor μ opióide no núcleo accumbens (NAC).....	40
Figura 6 –	Efeito da exposição neonatal à nicotina nas proles aos 15 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT e receptor μ opióide no estriado dorsal (DS).....	41
Figura 7 –	Efeito da exposição neonatal à nicotina nas proles aos 15 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas D2R, OBR-b, pJAK2, pSTAT3, SOCS3, NPY e POMC no núcleo arqueado (ARC).....	42
Figura 8 –	Efeito da exposição neonatal à nicotina nas proles aos 21 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT e receptor μ opióide no núcleo accumbens (NAC).....	43
Figura 9 –	Efeito da exposição neonatal à nicotina nas proles aos 21 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT e receptor μ opióide no estriado dorsal (DS).....	44
Figura 10 –	Efeito da exposição neonatal à nicotina nas proles aos 21 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas D2R, OBR-b, pJAK2, pSTAT3, SOCS3, NPY e POMC no núcleo arqueado (ARC).....	45

Figura 11 –	Efeitos da exposição neonatal à nicotina sobre o comportamento no labirinto em cruz elevado e no campo aberto.....	46
Figura 12-	Efeito da exposição neonatal à nicotina sobre a ingestão e preferência alimentar. A) O consumo total alimentar (em gramas) em cada um dos grupos em P150 e P160.....	48
Figura 13-	Efeito da exposição neonatal à nicotina sobre o comportamento no labirinto em cruz elevado e nos testes de campo aberto.....	49
Figura 14-	Efeito da exposição materna à nicotina nas proles aos 170 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, OBRb, e SOCS3 na area tegmentar ventral (VTA).....	50
Figura 15-	Efeito da exposição materna à nicotina nas proles aos 170 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, DDC, D2R, DAT e receptor μ opióide no núcleo accumbens (NAC).....	51
Figura 16-	Efeito da exposição materna à nicotina nas proles aos 170 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, DDC, D2R, DAT e receptor μ opióide no estriado dorsal (DS).....	52
Figura 17-	Efeito da exposição materna à nicotina nas proles aos 170 dias de idade sobre o conteúdo da proteína D2R no núcleo arqueado (ARC)....	53
Figura 18-	Efeitos da exposição neonatal ao fumo do tabaco na ingestão e preferência alimentar.....	54
Figura 19-	Efeitos da exposição neonatal à fumaça do tabaco sobre o comportamento no labirinto em cruz elevado e no campo aberto	55
Figura 20-	Efeitos da exposição neonatal ao fumo do tabaco no conteúdo das proteínas TH e da via de sinalização da leptina na area tegmentar ventral (VTA).....	56
Figura 21-	Efeitos da exposição neonatal ao fumo do tabaco no conteúdo das proteínas TH, DDC, D1R, D2R, DAT e receptor μ de opióide no núcleo accumbens (NAC).....	57
Figura 22-	Efeitos da exposição neonatal ao fumo do tabaco no conteúdo das proteínas TH, DDC, D1R, D2R e DAT no estriado dorsal (DS).....	58
Figura 23-	Efeitos da exposição neonatal ao fumo do tabaco no conteúdo das proteínas D2R, OBR-b, pJAK2, pSTAT3, SOCS3, NPY e POMC no núcleo arqueado (ARC).....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ACTH	Hormônio corticotrófico
AgRP	Peptídeo relacionado ao gene agouti
ARC	Núcleo arqueado
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DAT	Transportador de dopamina
DDC	Dopa decarboxilase
DR	Receptor dopaminérgico
DS	Estriado dorsal
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IV	Intracerebroventricular
JAK	Janus kinase
pJAK-2	Janus kinase 2 - fosforilada
NPY	Neuropeptídeo Y
NAc	Núcleo accumbens
OBR	Receptor de leptina
PN	Pós natal
PI3	Fosfatidilinositol 3
POF	Pesquisa de orçamentos familiares
POMC	Pró-opiomelanocortina
pSTAT-3	Transdutor do sinal e ativador da transcrição-3 fosforilada
TH	Tirosina hidroxilase
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TSH	Tireotrofina
SOCS-3	Proteína supressora de sinalização de citocina-3
VLDLc	Lipoproteína de muito baixa densidade

VTA

Área tegmentar ventral

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	24
1.1	Geral	24
1.2	Específicos	24
2	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1	Modelo experimental	26
2.2	Testes comportamentais	29
2.2.1	<u>Labirinto em cruz elevado (LCE)</u>	29
2.2.2	<u>Campo aberto (CA)</u>	30
2.3	Eutanásia	31
2.3.1	<u>Isolamento das regiões cerebrais</u>	31
2.4	Análise do conteúdo das proteínas por Western Blotting	32
2.4.1	<u>Processamento das regiões</u>	32
2.5	Análises estatísticas	33
3	RESULTADOS	34
3.1	Efeitos da exposição à nicotina no sistema dopaminérgico e ARC das lactantes no fim da lactação	34
3.2	Efeitos da exposição à nicotina sobre o sistema dopaminérgico e ARC da prole em PN15	38
3.3	Efeitos da exposição à nicotina sobre o sistema dopaminérgico e ARC da prole em PN21	41
3.4	Efeitos da exposição à nicotina sobre o comportamento da prole em PN14 e PN20	44
3.5	Efeito da exposição materna à nicotina sobre o consumo de alimentos e da preferência alimentar após 12 h de jejum	45
3.6	Efeito da exposição materna à nicotina sobre o comportamento	47
3.7	Efeito da exposição materna à nicotina sobre o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico	48
3.8	Efeito da exposição à fumaça do tabaco sobre o consumo e a preferência alimentar após 12 h de jejum	51

3.9	Efeito da exposição à fumaça do tabaco sobre o comportamento no labirinto em cruz elevado e no campo aberto.....	52
3.10	Efeitos da exposição à fumaça do tabaco sobre o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico.....	54
4	DISCUSSÃO.....	58
	CONCLUSÕES.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73

INTRODUÇÃO

Nicotina: principal componente do cigarro que causa dependência

A nicotina é uma substância alcalóide que se liga e exerce seus efeitos através dos receptores nicotínicos de acetilcolina (ACh) nos gânglios autônomos, na medula adrenal, na junção neuromuscular e no sistema nervoso central. Sua meia vida é de aproximadamente duas horas (Hukkanen et al, 2005; Benowitz et al, 2009). Em fumantes, sua concentração sérica varia entre 15 a 50 ng/mL (Balfour, 1990). Um único cigarro fumado faz com que a concentração plasmática de nicotina se eleve de 15 a 30 ng/mL, caindo por cerca da metade dentro de 10 minutos. Esse declínio rápido é resultado principalmente da redistribuição entre o sangue e os outros tecidos. A seguir, o declínio é mais lento, em torno de 1-2 horas de meia-vida, em função do metabolismo hepático, principalmente pela oxidação da nicotina em um metabólito cetônico, a cotinina (Hukkanen et al, 2005; Benowitz et al, 2009).

A nicotina é absorvida rapidamente do cigarro fumado. Ao entrar na circulação arterial é rapidamente distribuída pelos tecidos do corpo, atingindo o cérebro em um intervalo de 10 e 19 segundos (Henningfield et al, 1993). Ela é imediatamente absorvida pelo trato respiratório, mucosas orais e pele. Por ser uma base relativamente forte, sua absorção pelo estômago é limitada, a não ser que o pH intragástrico esteja elevado.

De acordo com o número de cigarros consumidos, classifica-se o fumante em: leve/moderado (<20 cigarros/dia) ou pesado (≥20 cigarros/dia). A concentração de nicotina nos cigarros varia entre países e marcas (Cavalcante, 2001).

Na fumaça do cigarro, a nicotina é a principal substância farmacologicamente ativa, sendo assim, os efeitos agudos do fumo podem ser mimetizados pela nicotina (Rang et al, 2004; Benowitz et al, 2009).

A cotinina, principal metabólito da nicotina, pode ser medida no sangue, urina, saliva (Nel & Morgan, 1996) e leite (Luck et al, 1985). Por possuir meia-vida de eliminação longa, cerca de 20 horas (Taylor, 1996), a cotinina é considerada um ótimo parâmetro para avaliar o índice de exposição ao fumo, sendo mais eficiente do que a própria nicotina, que possui meia-vida relativamente curta (Eskenazi et al, 1995).

Alguns fatores podem influenciar no estabelecimento da dependência da nicotina, tais como, idade e predisposição genética. A idade em particular, tem um papel crítico no desenvolvimento do uso e do abuso da nicotina. Foi demonstrado que 77% dos indivíduos fumantes fumaram o primeiro cigarro antes dos 17 anos (Breslau & Peterson, 1996). Destes,

os indivíduos que se tornaram tabagistas antes dos 17 anos, apresentaram menor probabilidade de cessar o hábito na vida adulta. Outros estudos também demonstraram que a maioria dos fumantes começa o hábito de fumar entre os 14 e 17 anos (55%) e que o tabagismo no início da adolescência é associado com menor probabilidade de desistência (Chen & Millar, 1998).

Por outro lado, é bem conhecido que a gestação, lactação e a adolescência são considerados períodos críticos do desenvolvimento devido a capacidade de se adaptar a mudanças no ambiente (de Moura & Passos, 2005; de Moura et al, 2008; Metcalfe & Monaghan, 2001). Alterações nesses períodos do desenvolvimento, tais como a exposição ao fumo ou à nicotina, podem permanentemente afetar as proles.

Efeitos do fumo e da nicotina na gravidez e lactação

No Brasil, aproximadamente 16% da população adulta faz uso do tabaco e, especialmente entre as mulheres, o tabagismo vem sendo associado a alterações de parâmetros reprodutivos como fertilidade, tempo de gestação, abortos espontâneos, gravidez ectópica e redução do período de amamentação (Mello et al, 2001; Einarson & Riordan, 2009).

O cigarro é a droga mais utilizada na gestação (Lambers & Clark, 1996; Müller et al, 2002) e está associado a alterações como abortos espontâneos, nascimentos prematuros, bebês de baixo peso, morte fetal e do recém-nato, complicações placentárias e episódios de hemorragia. Tais problemas se devem, principalmente, aos efeitos do monóxido de carbono e da nicotina. Um único cigarro fumado por uma gestante é capaz de acelerar os batimentos cardíacos do feto em poucos minutos. Observa-se aumento da frequência cardíaca materna, da frequência cardíaca fetal e das pressões arteriais sistólica e diastólica imediatamente após o ato de fumar da mãe (Müller et al, 2002).

Viver em ambiente poluído pela fumaça do cigarro é um risco para o feto e para o recém-nato, pois a gestante absorve as substâncias tóxicas da fumaça do cigarro, que são transferidas para o feto (Rosemberg, 2002). Gestantes fumantes ou não fumantes, mas que foram expostas ao fumo nos domicílios e/ou locais de trabalho, apresentam cotinina na urina e no sangue, e seus fetos possuem cotinina no sangue, no fluido amniótico e celômico (Jauniaux et al, 1999).

Embora tenha sido demonstrado que muitas mulheres param de fumar na gestação (Giglia et al, 2006; Polańska et al, 2007), alguns estudos revelam que a maioria das mulheres que interromperam este hábito, o retomam na lactação, mesmo que a maioria não fume durante a amamentação (McBride & Pirie, 1990; Hannover et al, 2008).

Durante a lactação, a nicotina é transferida pelo leite materno e causa taquicardia na prole devido a maior ação adrenérgica (Silva et al, 2002). As concentrações de nicotina e cotinina na urina do bebê são maiores quando a lactante é tabagista comparada aos níveis encontrados quando as mães são fumantes passivas (Woodward, 1986).

Assim, o ato de fumar na lactação é danoso não só para as mães, mas também para os lactentes que se expõe aos componentes do cigarro involuntariamente. Um estudo com macacos Rhesus demonstrou que a exposição tabágica no período da gestação e lactação promoveu danos no desenvolvimento cerebral com alterações na expressão de proteínas de sinapses serotoninérgicas ao desmame, podendo contribuir para o aparecimento de alterações neurocomportamentais e bioquímicas na vida adulta (Slotkin et al, 2006a; 2006b).

Programação metabólica ou plasticidade ontogenética

Diversos estímulos ou agentes estressores em períodos críticos do desenvolvimento, como gestação e lactação, podem “imprimir” (imprinting) mudanças metabólicas permanentes na vida adulta. Esse fenômeno inicialmente foi definido como programação metabólica, ou simplesmente programação (Lucas, 1998). Dentre os fatores programadores destacam-se a nutrição, hormônios e estímulos ambientais (Moura & Passos, 2005; de Moura et al, 2008). Se o estímulo inicial ou o agente estressor permanecer ao longo da vida do indivíduo, este será melhor adaptado. Do contrário, se o estímulo inicial for apenas transitório, poderá ser menos adaptado e mais propício ao desenvolvimento de doenças na vida adulta. Atualmente o termo programação, tem sido substituído pelo conceito de plasticidade ontogenética, devido a sua natureza probabilística e não determinista (Gluckman & Hanson, 2007; Gluckman et al, 2010). O principal mecanismo proposto como desencadeador da programação são alterações epigenéticas. Tais alterações podem ocorrer no útero ou no início da vida da criança (principalmente no período da lactação), decorrente de diversos estímulos (ambientais, nutricionais ou hormonais) que podem ativar processos de metilação de DNA, acetilação/deacetilação de histona, presença de RNA de interferência, os quais podem, por exemplo, suprimir genes relacionados ao controle da adipogênese, podendo afetar o desenvolvimento do tecido adiposo dependendo do estado nutricional (Lisboa et al, 2012).

Considerando o vasto número de estudos que focam o período da gestação como período de imprinting e a escassez de estudos focando a lactação como um importante período de desenvolvimento para os mamíferos, nosso laboratório iniciou trabalhos que investigam as alterações nutricionais e hormonais ocorridas exclusivamente no período da lactação e suas possíveis consequências em longo prazo. Essa linha de trabalho já é desenvolvida há

aproximadamente 15 anos, e mais recentemente, começamos também a investigar o imprinting por fatores ambientais (aproximadamente 10 anos).

Programação pela nicotina

Assim como as alterações hormonais e nutricionais no início da vida, fatores ambientais também são capazes de programar alterações metabólicas na prole (Grüin & Blumberg, 2009; Newbold, 2010). Determinadas substâncias presentes no ambiente são capazes de interagir com receptores endócrinos, exercendo um efeito semelhante ao do hormônio, sendo conhecidas como disruptores ou interferentes endócrinos. Dentre os diversos disruptores endócrinos encontrados no ambiente (fitoestrógenos, e pesticidas, por exemplo), nosso grupo escolheu estudar a nicotina pelo fato do tabagismo ser um importante problema de saúde pública e a nicotina o principal componente químico do tabaco, responsável pela dependência química, sendo transferida pelo leite materno para a sua prole (Luck & Nau, 1984; Churg & Prior, 1985; Rosemberg, 2004).

Desenvolvemos um modelo experimental no qual ratas lactantes são expostas à nicotina do 2º ao 15º dia da lactação, em uma concentração similar à de uma fumante pesada, 6mg/kg. Neste modelo, verificamos alterações nas lactantes expostas à nicotina, tais como grande quantidade de cotinina no soro (239 ng/ml) e no leite (226 ng/ml), maior conteúdo de lactose (Oliveira et al, 2010b) e T3 no leite (Oliveira et al, 2011). No fim da lactação, sem a presença da droga, as mães apresentaram maior leptina no leite e no soro que podem explicar a menor ingestão alimentar (Oliveira et al, 2010b). Os filhotes apresentaram aos 15 dias de vida (fim da exposição materna à nicotina), cotinina no soro (20,4 ng/ml), maior massa de gordura visceral, hiperleptinemia e hipotireoidismo primário, caracterizado por redução de T3 e T4 e aumento de TSH (Oliveira et al, 2009). Além dessas alterações, as proles também apresentaram alterações da função adrenal, tais como, hipercorticosteronemia e aumento do conteúdo de catecolaminas adrenais (Oliveira et al, 2010b). Ao desmame, sem a presença da nicotina, todas as alterações apresentadas na prole aos 15 dias foram normalizadas.

Ozokutan et al (2005) também demonstraram danos ocorridos nas proles de ratas expostas à nicotina durante os 10 primeiros dias da lactação, que apresentaram menor ganho de peso durante o período da exposição à nicotina, além de aumento do estresse oxidativo, demonstrado pela redução da quantidade de catalase e superóxido dismutase, e aumento de malondialdeído no fígado.

Em nosso modelo de exposição precoce à nicotina, além das alterações observadas no final do período da exposição, a prole apresentou na idade adulta aumento de massa corporal

e adiposidade central, hiperleptinemia (Oliveira et al, 2009) e aumento do conteúdo de leptina no tecido adiposo visceral (Pinheiro et al, 2011), hipotireodismo secundário, ou seja menor TSH, T4 e T3 (Oliveira et al, 2009), resistência à insulina (Oliveira et al, 2010a) e resistência central ao efeito anorexigênico da leptina (Oliveira et al, 2010a; Santos-Silva et al, 2010). Esses animais também apresentam disfunções adrenais, tais como aumento de CRH no núcleo paraventricular, aumento de ACTH hipofisário, hipercorticosteronemia e menor secreção de catecolaminas pelas medulas adrenais in vitro, quando estimuladas por cafeína (Pinheiro et al, 2011). Essa menor secreção de catecolaminas adrenais em conjunto a hipercorticosteronemia e ao hipotireoidismo podem em parte explicar o sobrepeso encontrado nesses animais.

Nossos resultados com nicotina isolada corroboram dados já descritos na literatura em relação a exposição tabágica ou à nicotina em períodos críticos do desenvolvimento, levando a obesidade, a curto e a longo prazo, tanto em modelos experimentais quanto em estudos epidemiológicos (Kries et al, 2002; Toshke et al, 2002, Wideroe et al, 2003; Bergmann et al, 2003; Gao et al, 2005; Goldani et al, 2007).

O conjunto dos nossos resultados mostra que a exposição materna exclusiva à nicotina exerce efeitos deletérios em curto e em longo prazo na prole. Contudo, nosso modelo de programação pela nicotina não retrata exatamente o que ocorre na sociedade, uma vez que a exposição à nicotina ocorre através do fumo do cigarro, sendo associada a outros componentes importantes, tais como, tiocianato, monóxido de carbono e outros gases tóxicos (Stellman & Djordjevic, 2009). Diante dessas informações nosso grupo criou um modelo de programação metabólica pela exposição à fumaça do cigarro.

Programação pelo tabaco

Atualmente verifica-se que filhos de mães fumantes são expostos aos componentes do cigarro não somente pelo leite materno, mas também no ambiente doméstico através da fumaça do cigarro. Em 2009, a OMS demonstrou que 40% das crianças são submetidas aos componentes do cigarro através da poluição tabagista ambiental, onde pelo menos um dos pais é fumante. Já foi demonstrado que crianças expostas a ambientes tabágicos apresentam diminuição de HDL-c, hiperleptinemia, aumento dos níveis de proteína C-reativa, fibrinogênio e interleucina 6 (Nagel et al, 2009) os quais sugerem maior suscetibilidade à doenças cardiovasculares. Por outro lado, crianças de mães fumantes apresentam a medida de dobra cutânea maior que as nascidas de mães não fumantes (Vik et al, 1996). Diante desses achados, desenvolvemos um modelo de programação metabólica onde mãe e prole foram expostas à fumaça do cigarro durante a lactação (4X ao dia durante 1h por vez), na

concentração de nicotina de 1,74 mg/cigarro. Constatamos alta concentração de cotinina no soro e no leite das ratas lactantes (105,1 ng/ml e 107,6 ng/ml, respectivamente) além de alterações metabólicas tais como, hiperprolactinemia, hipoinsulinemia, hipoleptinemia e hipertrigliceridemia. Tais alterações repercutiram em maior concentração de lactose e triglicérides no leite (Santos-Silva et al, 2011). Com relação às proles, a exposição à fumaça do cigarro (pelo ambiente e via leite), desencadeou ao desmame (fim da exposição tabágica) presença de cotinina no soro (145,3 ng/ml), menor massa corporal e comprimento, além de menor quantidade de gordura retroperitoneal, hipoinsulinemia, hipertiroxinemia, hipercorticosteronemia e maior conteúdo de catecolaminas adrenais. Quando adultos, os animais programados apresentaram hiperfagia, maior gordura corporal e visceral, hiperleptinemia, hipertrigliceridemia, aumento de VLDL-c, hiperglicemia, hipertireoidismo secundário (aumento de TSH, T4 e T3) e diminuição da função adrenal, caracterizada por hipocorticosteronemia e menor conteúdo de catecolaminas adrenais (Santos-Silva et al, 2013). A reunião de nossos resultados demonstra que a exposição direta à fumaça do cigarro durante a lactação programa para hiperfagia, obesidade, dislipidemia e outros distúrbios endócrino-metabólicos.

Via de recompensa cerebral: o papel da dopamina

A via de recompensa cerebral é composta pela área tegmentar ventral (VTA) e o núcleo accumbens (NAc). O VTA projeta seus axônios dos neurônios dopaminérgicos, liberando dopamina para o NAc. A dopamina no NAc ativa receptores dopaminérgicos gerando sensação de prazer e bem-estar. As vias de sinalização dopaminérgica e de opióide no sistema mesolímbico de recompensa têm um importante papel tanto na recompensa quanto no processo motivacional (Erlanson-Albertsson, 2005; Berthoud 2006; Fulton, 2010). Os receptores dopaminérgicos D1R e D2R no NAc (Durieux et al, 2009; Breese et al, 1987; De Vries et al, 1998; Dreher & Jackson, 1989; Gong et al, 1999; Meyer, 1993; Swanson et al, 1997) e no estriado dorsal (Durieux et al, 2012; Pitts & Horvitz, 2000) têm sido associados com comportamentos como ansiedade, medo e atividade locomotora. Alterações na ativação desses receptores, como exposição à nicotina, podem causar mudanças comportamentais.

Qualquer substância, tais como, drogas de abuso, como a nicotina, (Bozarth & sábio, 1981; Gessa et al, 1985; McBride et al, 1999; Elogio et al, 2004; Mifsud et al, 1989; Nisell et al, 1994; Westerink et al, 1987; Yoshimoto et al, 1992) e alimentos palatáveis, que ative a via de recompensa cerebral, repercutindo na liberação de dopamina repetidamente, ou que reduza a sua recaptção, que é realizada pelo transportador de dopamina (DAT), é capaz de gerar

dependência, podendo ser um forte candidato para o vício e o abuso. Diversos estudos têm demonstrado que muitos alimentos como, dietas de cafeteria, açúcar, sacarina, sacarose e óleo de milho, podem liberar dopamina no NAc (Bassareo & Di Chiara, 1997; Hajnal et al, 2004; Liang et al, 2006; Mark et al, 1991; Rada et al, 2005b).

Sabe-se que a leptina e a insulina podem modular o sistema de recompensa cerebral, pois apresentam receptores no VTA que quando ativados geram diminuição dos sinais de recompensa, tais como diminuição da ingestão de comidas palatáveis ou da utilização de outras drogas. Já foi demonstrado que a administração intracerebroventricular (IV) de insulina aumenta o RNAm do DAT (Figlewicz et al, 1994), através da ativação da cascata intracelular da PI3 quinase (Garcia et al, 2005). Figlewicz e colaboradores (2007) sugere que o significado funcional para o aumento de DAT é porque a dopamina liberada deve ser retirada mais eficazmente das sinapses, conseqüentemente, diminuindo a sinalização da dopamina. Com relação à leptina, esta modula o sistema de recompensa a partir da ativação da sua via clássica, JAK-STAT, resultando na diminuição da taxa de liberação de dopamina (Hommel et al, 2006). Assim, após uma alimentação palatável, ocorre uma grande liberação de dopamina que faria com que o animal aumentasse a procura ou ingestão deste mesmo alimento. Isto é regulado pela liberação simultânea de insulina e/ou leptina que modulam esta resposta, através do aumento da recaptção ou diminuição da liberação de dopamina.

De modo contrário, estudos experimentais demonstraram que animais resistentes à leptina ou à insulina, não respondem ao efeito de diminuição da recompensa (Figlewicz et al, 2007), podendo ser fortes candidatos ao vício alimentar ou drogas de abuso. Por outro lado, já foi demonstrado que pessoas obesas que comem compulsivamente, apresentam disfunções no sistema de recompensa que os levam ao vício alimentar (Johnson & Kenny, 2010). Considerando que, no geral, indivíduos obesos podem apresentar resistência à leptina/insulina, é provável que essa resistência seja um fator desencadeador para o vício alimentar comum em indivíduos obesos.

Em nosso laboratório, os modelos de programação pela nicotina e pela fumaça do cigarro programam para obesidade e resistência a leptina e insulínica, portanto, é possível que estas proles obesas se tornem mais susceptíveis ao vício alimentar.

Tabagismo e vício alimentar

Sabe-se que fumantes preferem ingerir alimentos não saudáveis ricos em açúcar e gordura (Dallongeville et al, 1998). Corroborando esses dados epidemiológicos, um estudo experimental evidenciou que ratos expostos cronicamente à nicotina ingerem maior

quantidade de sacarose (Jias & Ellison, 1990). Considerando que tais alimentos agem na via de recompensa cerebral, da mesma forma que à drogas de abuso, incluindo a nicotina, a explicação para tais escolhas alimentares pode ser devido ao fato de existir um mecanismo de “sensibilização cruzada” onde a sensibilização do sistema por uma determinada droga ou alimento, pode levar a subsequente utilização de outras drogas (Henningfield et al, 1990; Liguori et al, 1997; Hubbell et al, 1993; Nichols et al, 1991; Volpicelli et al, 1991; Vargas et al, 1999) ou alimentos palatáveis. De fato, já foi demonstrado que animais viciados em anfetamina apresentam maior ingestão de açúcar (Avena & Hoebel, 2003).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que crianças de pais fumantes são mais vulneráveis a se tornarem viciadas em drogas e alimentos palatáveis do que filhos de pais não fumantes (Vargas et al, 1999). Além disso, filhos de gestantes fumantes apresentam, na idade adulta, alteração na escolha alimentar. Neste estudo de coorte, foi verificado que indivíduos adultos, cujas mães fumaram no período gestacional, consumiam mais carboidratos em detrimento de proteínas quando comparado aos filhos cujas mães não foram expostas ao tabagismo (Ayres et al, 2011). Estudos experimentais demonstraram que a exposição à poluição tabágica durante a gravidez aumenta o consumo de dieta palatável nas proles (Al Mamun et al, 2006; Franke et al, 2008). O conjunto desses dados mostra a relação entre a exposição ao tabagismo ou a nicotina com o desenvolvimento de maus hábitos alimentares na vida adulta.

Justificativa do presente estudo

Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009), há uma crescente disponibilidade e consumo de alimentos hipercalóricos, industrializados e ricos em açúcar e gordura entre as famílias brasileiras. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) realizou um estudo onde foi observado que doenças como obesidade, hipertensão e diabetes, ocorrem em decorrência da má alimentação das famílias brasileiras (IBGE, 2010). Essa situação é preocupante uma vez que esses alimentos podem ser considerados drogas, gerando dependência alimentar.

Esses dados, somados ao aumento do tabagismo no mundo, torna importante estudar a relação da exposição precoce à poluição tabágica ou à nicotina (que sabidamente altera as vias centrais ligadas a ingestão alimentar) e sua possível capacidade de programar para o vício alimentar, ou ainda levar a maior predisposição a utilização ao abuso de drogas.

Hipótese do trabalho

Assim nossa hipótese é que a exposição à nicotina ou fumo durante a lactação induzem modificações no sistema dopaminérgico de recompensa cerebral contribuindo para uma preferência alimentar obesogênica.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Estudar os efeitos da exposição materna à nicotina na lactação e da exposição direta da fumaça do cigarro durante a lactação sobre o sistema mesocorticolímbico das proles na idade adulta.

1.2 Específicos

Nas mães lactantes expostas à nicotina do 2º ao 15º dia da lactação, aos 21 dias da lactação, avaliar:

- O conteúdo das proteínas TH, OBRb, pJAK2, pSTAT3 e SOCS3 no VTA;
- O conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT, receptor μ opioide no NAC;
- O conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT, receptor μ opioide no DS;
- O conteúdo das proteínas D2R, OBRb, pJAK2, pSTAT3, SOCS3, NPY e POMC no ARC.

Nas proles lactentes cujas mães foram expostas à nicotina na lactação, aos 14 e 20 dias de vida, avaliar:

- O comportamento no labirinto em cruz elevado e no campo aberto.

Nas proles lactentes cujas mães foram expostas à nicotina na lactação, aos 15 e 21 dias de vida, avaliar:

- O conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT e receptor μ opioide no NAC;
- O conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT e receptor μ opioide no DS;
- O conteúdo das proteínas D2R, OBR-b, pJAK2, pSTAT3, SOCS3, NPY e POMC no ARC;

Nas proles adultas cujas mães foram expostas à nicotina na lactação, aos 15 e 21 dias de vida, avaliar:

- A preferência alimentar (em gramas) em cada um dos grupos em P150 e P160;
- O comportamento no labirinto em cruz elevado e nos testes de campo aberto;
- O conteúdo das proteínas TH, OBRb, e SOCS3 no VTA;
- O conteúdo das proteínas TH, DDC, D2R, DAT e receptor μ opióide no NAc;
- O conteúdo das proteínas TH, DDC, D2R, DAT e receptor μ opióide no DS;
- O conteúdo da proteína D2R no ARC.

Nas proles adultas que foram expostas à fumaça do cigarro, durante a lactação, diretamente e via leite materno, avaliar:

- O efeito da exposição neonatal ao fumo do tabaco na ingestão e preferência alimentar;
- O comportamento no labirinto em cruz elevado e no campo aberto;
- O conteúdo das proteínas TH e da via de sinalização da leptina no VTA;
- O conteúdo das proteínas TH, DDC, D1R, D2R, DAT e receptor μ de opióide no NAc;
- O conteúdo das proteínas TH, DDC, D1R, D2R e DAT o DS;
- O conteúdo das proteínas D2R, OBR-b, pJAK2, pSTAT3, SOCS3, NPY e POMC no ARC.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Modelo experimental

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina (LFE) do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob temperatura ($23\pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo de claro-escuro (7:00 - 19:00 h) controlados, com livre acesso à água e ração. Os experimentos descritos a seguir foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do IBRAG (CEUA/066/2012; CEUA/019/2014).

Ratas Wistar nulíparas de 3 meses de idade foram acasaladas por 1 semana na proporção de 2 fêmeas para 1 macho. As fêmeas grávidas foram separadas em gaiolas individuais até o nascimento dos filhotes. Ao nascimento, cada ninhada foi ajustada para 6 filhotes por rata lactante para maximizar o potencial lactotrófico e as lactantes no 2º dia pós-parto, foram divididas em 2 modelos a seguir:

1º modelo: Exposição neonatal à nicotina

- **Grupo Nicotina** (N, n=16) – Ratas lactantes receberam implante subcutâneo de minibombas osmóticas (Alzet, 2ML2, California, USA), 2 dias após o parto. As bombas liberavam nicotina (6mg/Kg/dia) por 14 dias consecutivos.

- **Grupo Controle** (C, n=12) – Ratas lactantes foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos para o grupo NIC, porém as minibombas continham solução salina.

Antes da implantação, todas as minibombas foram mantidas em solução salina por 24 h para atingir uma liberação constante de nicotina. A solução de nicotina foi preparada de acordo com a seguinte fórmula:

$$(6\text{mg de nicotina} \times \text{massa corporal}) / (24 \times 5\mu\text{l} \times 0,001)$$

Onde:

6mg – Dose desejada de nicotina

Massa corporal – expressa em (Kg)

24 – Número de horas do dia

5 μ l – O volume liberado pela minibomba por hora

0,001 – Constante de correção

Para a implantação das minibombas, as mães foram anestesiadas (tiopental sódico, 0,6 mg/Kg do PC) seguida de tricotomia e assepsia com álcool etílico (70%). A introdução da minibomba foi feita por uma incisão longitudinal no dorso do animal, com auxílio de bisturi e tesoura roma e a pele foi suturada ao final do procedimento utilizando-se fio de sutura (catgut simples 3.0).

Desafio alimentar aos 150 (PN150) e 160 (PN160) dias de vida

Foram utilizados 50 C e 64 N, com 4 animais por ninhada. Em PN150 e PN160 as proles foram submetidas ao teste do desafio alimentar (2 animais por ninhada). Com o intuito de gerar compulsão alimentar (Avena et al. 2005), as proles foram deixadas em jejum no período de 09:00 até 21:00 horas. As 21:00 as dietas foram oferecidas durante um período de 12 horas. No dia seguinte, as 09:00h, a ingestão de alimentos foi avaliada pela diferença entre a ração oferecida inicialmente e o que restou na gaiola no final. Para a realização deste teste alimentar, os animais foram divididos em quatro grupos:

- Grupo 1 (C, n = 26) e Grupo 2 (N, n = 32) que recebeu apenas dieta padrão;
- Grupo 3 (C-DAS, n = 24) e Grupo 4 (N-DAS, n = 32) com uma dieta de auto-seleção (DAS).

Ambos os grupos de auto-seleção tiveram livre acesso para escolher entre a dieta rica em gordura (com mais de 20% de gordura saturada do que a dieta padrão) e \ ou dieta rica em sacarose (com mais de 38% de sacarose do que a dieta padrão).

2º modelo: Exposição neonatal à fumaça do cigarro e desafio alimentar em PN175

- **Grupo Exposição à Fumaça** (F, n=8) – ratas lactantes e seus filhotes foram colocadas na caixa de fumaça 4x dia/1h por vez até o final da lactação (21 dias). A caixa recebe fumaça gerada por uma máquina automática (Modelo TE-10, Teague Enterprises, Davis, CA, USA) que queima 1 cigarro de pesquisa 3R4F por vez (0,73 mg nicotina/cigarro; Tobacco Research

Institute, University of Kentucky, Lexington, KY, USA). Cada cigarro foi tragado a cada 9 minutos.

- **Grupo Controle** (C, n=10) – ratas lactantes e seus filhotes foram retirados de suas gaiolas 4x dia/1h por vez e expostos ao ar filtrado.

Teste da Preferência Alimentar em PN175

Foram utilizados 40 C e 32 F, com 4 animais por ninhada. Em PN175 as proles foram submetidas ao teste do desafio alimentar (2 animais por ninhada). Com o intuito de gerar compulsão alimentar (Avena et al. 2005), as proles foram deixadas em jejum no período de 09:00 até 21:00 horas. Para testarmos a voracidade dos animais pelo alimento, após o jejum, às 21:00h as dietas foram oferecidas durante um período de apenas 30 minutos. Após esse período as rações foram retiradas, pesadas (para a avaliação da ingestão alimentar) e devolvidas para a gaiola. Após o período de 12 horas, ou seja, no dia seguinte, as 09:00, a ingestão de alimentos foi avaliada pela diferença entre a ração oferecida e o que sobrou na gaiola. Para a realização deste teste alimentar, os animais foram divididos em quatro grupos:

- Grupo 1 (C, n = 20) e Grupo 2 (F, n = 16) que recebeu apenas dieta padrão;
- Grupo 3 (C-DAS, n = 20) e Grupo 4 (F-DAS, n = 16) com uma dieta de auto-seleção (DAS). Ambos os grupos de auto-seleção tiveram livre acesso para escolher entre a dieta rica em gordura (com mais de 20% de gordura saturada do que a dieta padrão) e \ ou dieta rica em sacarose (com mais de 38% de sacarose do que a dieta padrão).

Composições das dietas

Ambas as dietas, rica em gordura e rica em sacarose foram feitas utilizando ração comercial como fonte de proteína. As dietas foram preparadas de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (AIN 93M) recomendação para dietas de roedores (Reeves et al., 1993) e são mostrados na tabela 1.

Tabela 1 - Composição das dietas

	CARBOIDRATOS	LÍPIDOS	PROTEÍNA	VALOR
	(g)	(g)	(g)	ENERGÉTICO
				(Kcal)
DIETA RICA EM	78.9	6.8	14.3	461
SACAROSE				
DIETA RICA EM	58.9	26.8	14.3	561
GORDURA				
RAÇÃO COMERCIAL	66.0	11.0	23.0	455

Os valores estão relacionados com 100 gramas de cada ração.

2.2 Testes comportamentais

As proles do 1º modelo foram submetidas aos testes comportamentais em PN 14, PN20, PN152, PN153 e as proles do 2º modelo foram testadas apenas em PN178 e PN179. Todos os testes foram filmados e analisados posteriormente.

Antes dos testes comportamentais serem iniciados, os animais foram levados à sala de testes, permanecendo por 10 minutos, a fim de promover uma ambientação no local da sala de testes, de maneira a não comprometer as análises comportamentais. No momento do teste, o animal é colocado no equipamento e permanece sozinho na sala. Após o teste, o avaliador retornava e retirava o animal do equipamento.

2.2.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste do labirinto em cruz elevado é uma das formas de detecção de alterações nos níveis de ansiedade, sendo o teste comportamental mais utilizado em modelo animal de ansiedade (Carobrez e Bertoglio, 2005). Para esse teste utiliza-se um equipamento que tem formato de cruz contendo dois braços abertos (BA), dois braços fechados (BF), e uma área central entre os braços. Para os animais de PN14 e PN20 utilizamos um equipamento medindo 31cm de altura. Os braços apresentam 6cm de largura, 67cm de comprimento e, no caso dos braços fechados, as paredes apresentam 16cm de altura. Para os animais de PN152 e PN178, foi utilizado um equipamento maior: os braços com 50cm de comprimento x 10cm de largura, e

as paredes dos braços fechados com 40cm de altura. Esses braços ficam dispostos de forma perpendicular e elevados a 50cm do chão. Para dar início ao teste o animal é colocado na área central com a cabeça voltada para o braço aberto e seu comportamento é monitorado por uma câmera de vídeo durante 10 minutos. Após os 10 minutos o animal é retirado do equipamento. Antes que outro animal seja colocado, o equipamento é limpo com papel toalha e etanol a 70%.

A partir das imagens gravadas, foram quantificados o tempo que o animal ficou em cada local do equipamento (braços abertos, braços fechados e centro), e o número de vezes que ele entrou em cada local. As variáveis utilizadas como índices de ansiedade foram o tempo que o animal permaneceu nos braços abertos (Tempo BA) e seu percentual ($\text{Tempo BA} / (\text{Tempo BA} + \text{Tempo BF})$), número de entradas nos braços abertos (Entradas BA), e seu percentual ($\text{Entradas BA} / (\text{Entradas BA} + \text{Entradas BF})$). (Pellow et al., 1985; FRAGA-MARQUES e cols, 2009; FRAGA-MARQUES e cols, 2010). A avaliação do comportamento associado à ansiedade baseia-se na observação de que o BA constitui um ambiente aversivo para o animal, onde além de desprotegido ele está sujeito à queda, assim, a permanência no BA indica que o animal se arrisca mais explorando todos os braços do aparelho, refletindo um estado de menor ansiedade (Rodgers *et al.*, 1997). A atividade locomotora foi avaliada através do número de entradas no braço fechado (Rodgers *et al.*, 1997; Fraga et al., 2011; Fraga et al., 2014), e também pelo número de entradas no BA+BF (FRAGA-MARQUES e cols, 2009; FRAGA-MARQUES e cols, 2010). Uma entrada foi contabilizada quando o animal cruzava com as quatro patas um braço. O teste foi realizado entre 13 e 18h.

2.2.2 Campo aberto (CA)

Para os animais de PN14 e PN20 utilizamos um equipamento que consiste de uma caixa de madeira branca (37,6 cm de comprimento X 30,4 cm de largura X 17 cm de altura) e seu piso foi dividido por linhas em 16 retângulos do mesmo tamanho (7,6 X 9,4 cm) permitindo a definição de áreas periféricas e centrais. Para os animais adultos, PN153 e PN179, o CA utilizado apresentava as seguintes medidas: caixa de madeira (57 cm de comprimento X 57 cm de largura X 59 cm de altura) e seu piso foi dividido por linhas em 16 retângulos do mesmo tamanho (14,25 X 14,25 centímetros; 12 exterior e 4 interior).

No início da sessão, cada rato foi colocado na periferia da arena e a sua atividade foi registrada durante 5 min. A atividade locomotora foi quantificada com base no número de retângulos atravessados pelos animais no centro (CN) e na periferia (P) (Filgueiras et al., 2009). A travessia foi considerada válida quando o animal cruza a linha com todas as quatro patas.

Além disso, o número de entradas nos retângulos centrais corrigidos pelo total de deambulação [% Entradas CN: $CN / (CN + P)$] foi avaliada; a atividade no centro está inversamente relacionada com os níveis de ansiedade (Pena-Oliver et al, 2010;. e Prut Belzung, 2003). No fim de cada sessão de comportamento, o CA foi limpo com toalhas de papel embebidos em etanol a 50% e secos antes de cada ensaio. Todos os animais foram devolvidos às suas gaiolas, onde permaneceram até serem sacrificados.

2.3 Eutanásia

As proles do 1º modelo, exposição à nicotina, com 15, 21 e 170 dias de idade, as ratas lactantes no 21º da lactação e as proles do 2º modelo, exposição à fumaça do cigarro, com 180 dias de idade, foram anestesiadas com tiopental (Thiopentax, 30 mg / kg). A eutanásia foi realizada por remoção do sangue do animal pela técnica de punção cardíaca.

O cérebro inteiro foi cuidadosamente retirado e armazenado no freezer -80 °C para subsequente remoção das regiões de interesse.

2.3.1. Isolamento das regiões cerebrais

Para os procedimentos de isolamento dos cérebros dos ratos adultos, utilizou-se as coordenadas estereotáxicas como guia, de acordo com o atlas Paxinos e Watson (1998), utilizando-se o bregma como uma referência para a localização das secções coronais. Quanto aos procedimentos com os cérebros dos filhotes com PN15 e PN21, utilizou-se as coordenadas estereotáxicas do atlas de desenvolvimento de cérebro de rato por Sherwood e Timiras (1970), que analisa PN10 e PN21, usando os meatos auditivos externos como o plano vertical de referência zero (aqui , seguimos as instruções do atlas em que A corresponde a distância anterior para o ponto zero em milímetros). Para PN15, as referências para as posições do estriado dorsal (DS) e Nac também levou-se em consideração o formato do corpo caloso, a comissura anterior (parte anterior) e os ventrículos laterais posicionadas no topo da comissura anterior. Para o ARC, a posição dos ventrículos laterais, a aparência do hipocampo e a morfologia mais largos no fundo do terceiro ventrículo Foram utilizados como referências.

Adultos: Cortes coronais foram obtidos utilizando o criostato (Hyrax C25, Zeiss, Stuttgart Alemanha) e os punches do DS (bregma 1,70-0,48 mm), NAC (bregma 1,70-0,48 mm), ARC (bregma -1,6 a -2,6 mm) e VTA (bregma -5,60 a -6,30 mm) foram extraídos dos cérebros de acordo com Paxinos e Watson (1998).

Prole PN15: Punchs das seções coronais do DS (seção de 0,5 mm a partir das coordenadas cerca de A 6,5-6,0 mm), NAc (seção de 0,5 mm a partir das coordenadas cerca de A 6,5-6,0 mm), e ARC (seção de 0,6 mm a partir das coordenadas cerca de 3,5-2,9 mm) foram extraídos a partir dos cérebros de acordo com as referências e com base em Sherwood Timiras (1970).

Prole PN21: Punchs das seções coronais do DS (de A 7,5-7,0 mm), NAc (de A 7,5-7,0 mm), e ARC (a partir de A. 4.1 a 3,5 mm) foram extraídos a partir dos cérebros de acordo com Sherwood e Timiras (1970).

As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para posterior determinação do conteúdo proteico por western blotting.

2.4. Análise do conteúdo das proteínas por Western Blotting

Avaliamos o conteúdo das proteínas tirosina hidroxilase (TH) e a sinalização da leptina (OBRb, pJAK2, pSTAT3 e SOCS3) no VTA; conteúdo de TH, receptor dopaminérgico 1 (D1R), receptor de dopamina 2 (D2R), transportador dopaminérgico (DAT) e receptor μ opióides no NAc e DS; D2R, a sinalização da leptina, POMC e NPY conteúdos no ARC.

2.4.1 Processamento das regiões

Para isso, foi utilizado 7 amostras do grupo experimental e 7 amostras do respectivo controle. Para os filhotes com PN15 e PN21, foi realizado “pool” de duas amostras. Para a extração das proteínas, as amostras foram sonicadas duas vezes em um processador ultra-som durante 10 s (com um intervalo de 15 s) e amplitude de 40%, com tampão de lise (HEPES 50 mM, MgCl₂ a 1 mM, EDTA 10 mM, e 1% Triton X-100, pH 6,4) mais inibidores de proteases (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA). Para homogeneizar as regiões dos cérebro dos animais adultos, foi utilizado 15 μ L de tampão para homogeneizar o VTA, 70 μ L para o NAc, 140 μ L para o DS e 80 μ L para o ARC. Para homogeneizar as regiões cerebrais das proles, utilizamos 20 μ L de tampão para homogeneizar o NAc, 90 μ L para o DS e 40 μ L para o ARC. As amostras foram desnaturadas (95°C, 5 min) em presença de β -mercaptoetanol. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE). Utilizamos 10 μ g de proteínas totais por slot do gel. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Hybond-P ECL membrane; Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA). Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas (1½ h) em T-TBS acrescido de albumina (2%, 25°C) sob agitação constante. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com o respectivo anticorpo primário:

Anti-D1R (rabbit, 1:10.000); Anti-D2R (rabbit, 1:500); Anti-DAT (rabbit, 1:500); Anti-TH (mouse, 1:1.000); Anti-DDC (mouse, 1:2.000); Anti-receptor μ opioide (rabbit, 1:3.000); Anti-OBR-b (mouse, 1:1.000); Anti-pJAK2 (goat, 1:500); Anti-pSTAT3 (goat, 1:500); Anti-SOCS3 (rabbit, 1:500); Anti-NPY (rabbit 1:500); Anti-POMC (rabbit, 1:500); Anti-actina (mouse, 1:500), overnight, 5°C. Após este período, as membranas foram lavadas e incubadas com apropriado 2º anticorpo, conjugado à biotina por 1 h (25°C) sob agitação constante. Após mais uma seqüência de lavagens, as membranas foram incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase, na mesma concentração do anticorpo secundário utilizado (1 h, 25°C). As membranas foram lavadas novamente com T-TBS e posteriormente, as proteínas imunorreativas, presentes na membrana, foram visualizadas por quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences). As imagens das bandas foram analisadas e quantificadas com auxílio do programa Image J (media cybernetics).

2.5. Análise estatística

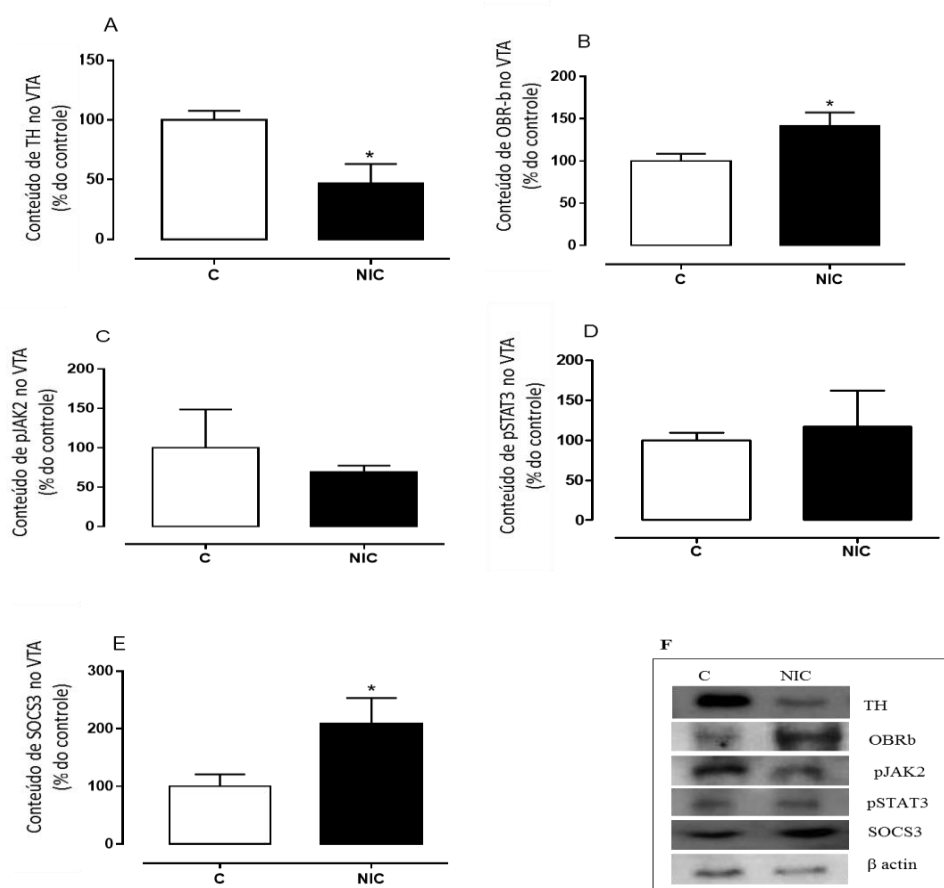
Os dados foram analisados com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 5 e expressos como média \pm erro padrão da média. O teste utilizado para testar a normalidade das distribuições dos dados foi o de Kolmogorov – Smirnov. O consumo e o desafio alimentar foram avaliados por ANOVA de repetição ANOVA multivariada e ANOVA univariada. Os Testes comportamentais foram analisados por ANOVA univariada. As demais análises foram analisadas pelo teste t student não pareado. O limite de significância adotado foi o de $P < 0.05$.

3 RESULTADOS

3.1 Efeitos da exposição à nicotina no sistema dopaminérgico e ARC das lactantes no fim da lactação

No VTA, lactantes NIC mostrou menor conteúdo de TH (-53%, $p < 0,05$, fig. 1A), maior conteúdo de OBRb (+ 42%, $p < 0,05$, fig. 1B) e SOCS3 (+ 109%, $p < 0,05$, fig. 1E) quando comparado com as ratas C. Não houve alterações nos conteúdos de pJAK2 e pSTAT3 (fig. 1C e 1D, respectivamente).

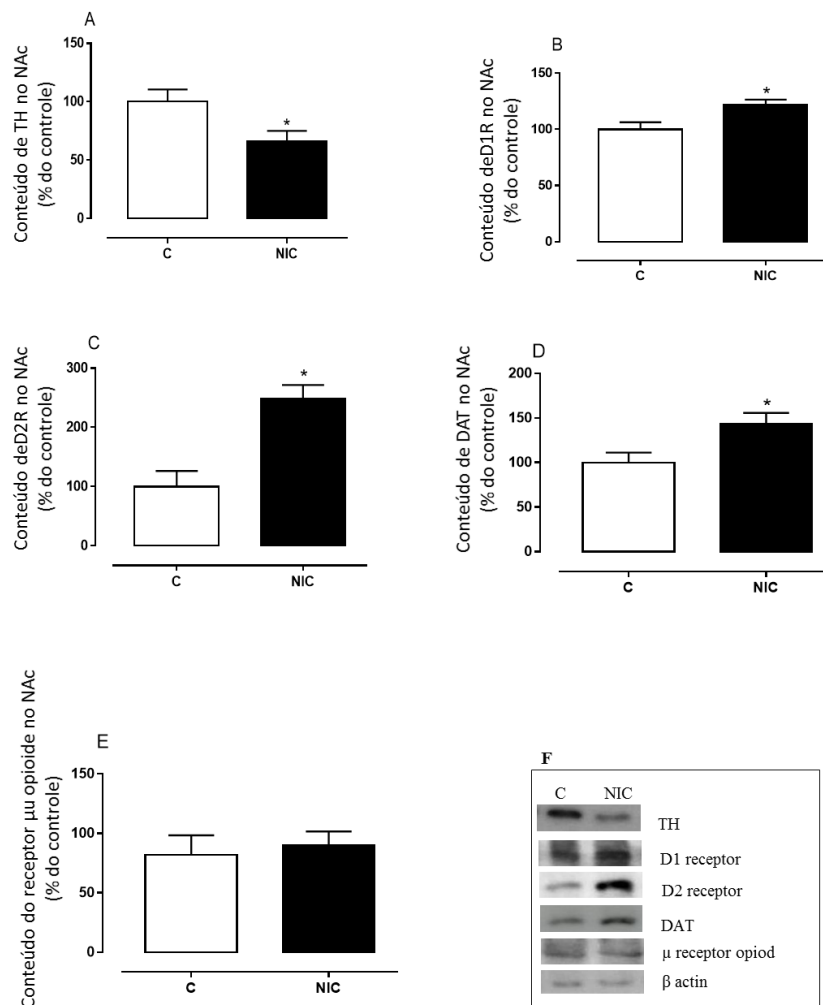
Figura 1 - Efeito da exposição à nicotina em ratas lactantes sobre o conteúdo das proteínas TH, OBRb, pJAK2, pSTAT3 e SOCS3 na area tegmentar ventral (VTA)



Legenda: Conteúdo de TH (A), OBRb (B), pJAK2 (C), pSTAT3 (D) e SOCS3 (E) no VTA das ratas lactantes que receberam nicotina ou salina durante a lactação. As bandas representam o conteúdo das proteínas no VTA individualmente das ratas C e NIC (F). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM ($n = 7$ por grupo). C: grupo controle; NIC: grupo nicotina. * $P < 0,05$.

No NAc, lactantes NIC apresentaram menor conteúdo de TH (-34%, $p < 0,05$, fig. 2A), maior D1R (+ 22%, $p < 0,05$, fig. 2B), D2R (+ 148%, $p < 0,05$, fig. 2C) e DAT (+ 44%, $p < 0,05$, fig. 2D) quando comparado com as ratas C. Nenhuma mudança no conteúdo do receptor μ opioide foi observada (Fig. 2E).

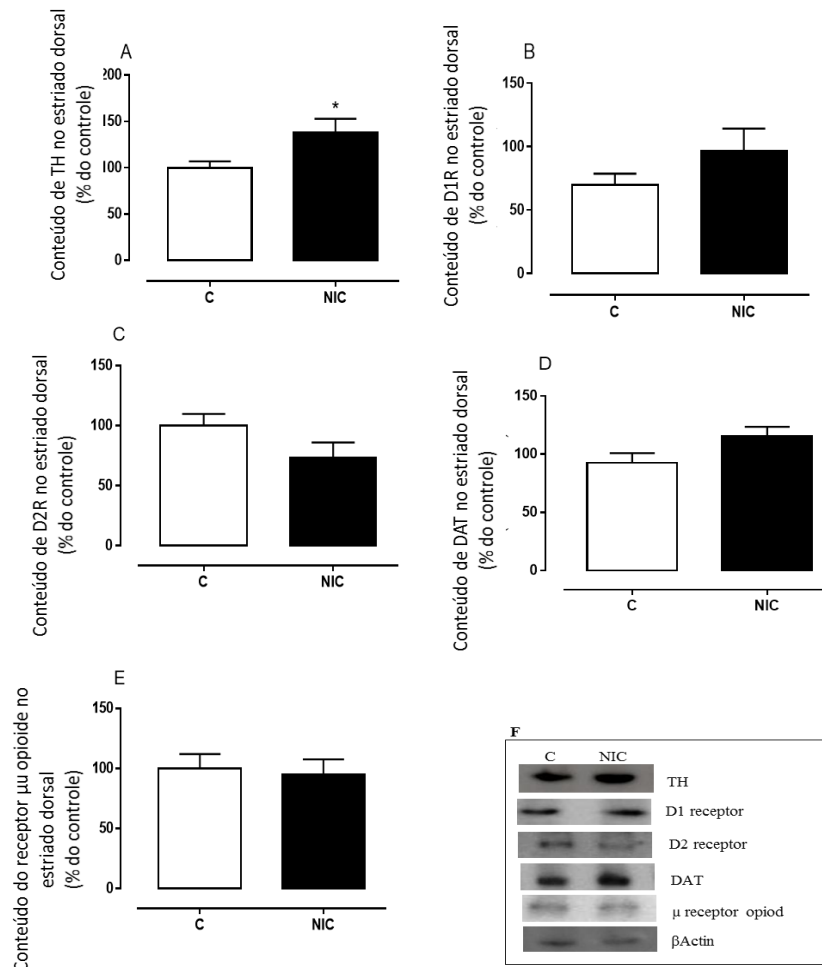
Figura 2- Efeito da exposição à nicotina em ratas lactantes sobre o conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT, receptor μ opioide no núcleo accumbens (NAc).



Legenda: Conteúdo de TH (A), D1R (B), D2R (C), DAT (D) e receptor μ opioide (E) no NAc das ratas lactantes que receberam nicotina ou salina durante a lactação. As bandas representam o conteúdo das proteínas no NAc individualmente das ratas C e NIC (F). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM ($n = 7$ por grupo). C: grupo controle; NIC: grupo nicotina. * $P < 0,05$.

No DS, lactantes NIC apresentaram apenas maior conteúdo de TH (+ 38%, $p < 0,05$, fig. 3A) quando comparadas as ratas C. Não houve diferença no conteúdo de D1R, D2R, DAT e receptor μ opioide entre os grupos (figs. 3B, 3C, 3D e 3E, respectivamente).

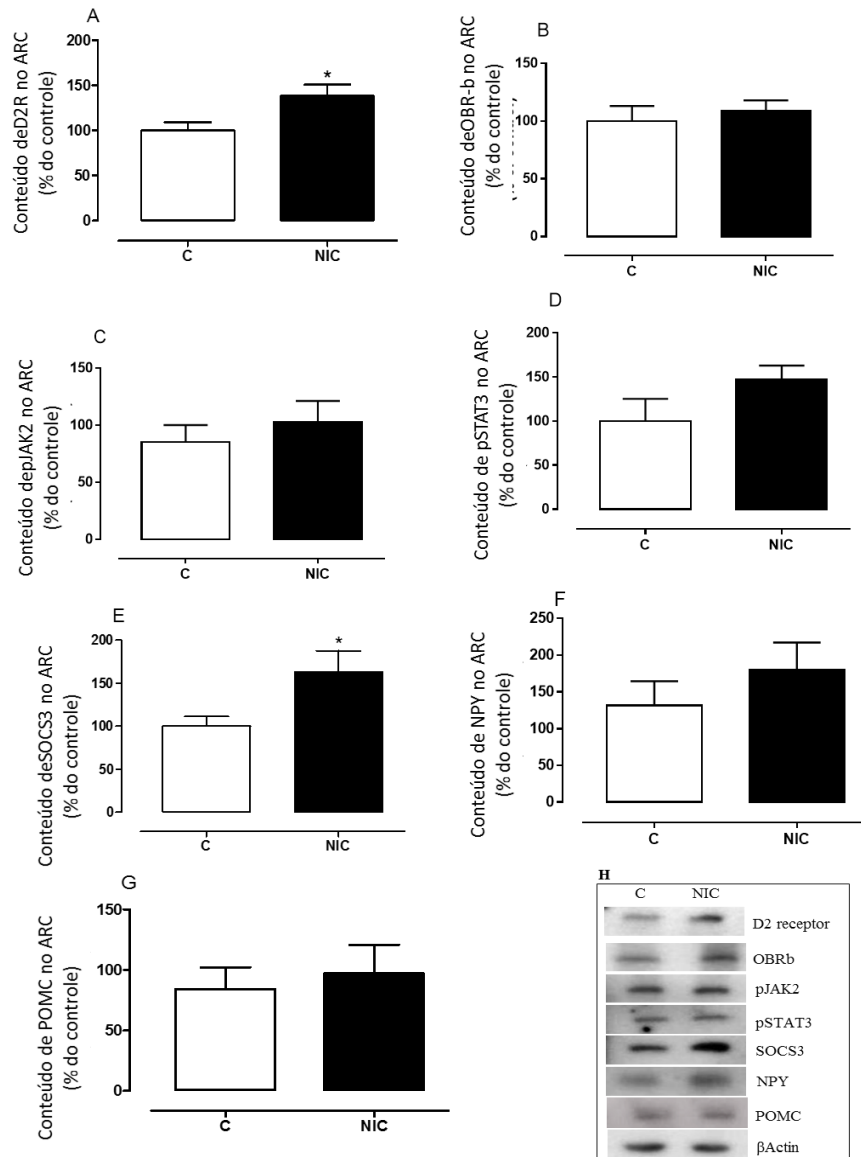
Figura 3: Efeito da exposição à nicotina em ratas lactantes sobre o conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT, receptor μ opioide no estriado dorsal (DS).



Legenda: Conteúdo de TH (A), D1R (B), D2R (C), DAT (D) e receptor μ opioide (E) no DS das ratas lactantes que receberam nicotina ou salina durante a lactação. As bandas representam o conteúdo das proteínas no DS individualmente das ratas C e NIC (F). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM ($n = 7$ por grupo). C: grupo controle; NIC: grupo nicotina. * $P < 0,05$.

No ARC, as ratas lactantes NIC apresentaram maior conteúdo de D2R (+ 39%, $p < 0,05$, fig. 4A) e SOCS3 (+ 63%, $p < 0,05$, fig. 4E) quando comparado com as ratas C. Não observamos alterações nos conteúdos de OBRb, pJAK2, pSTAT3, NPY e POMC entre os grupos (figs. 4B, 4C, 4D, 4F e 4G, respectivamente).

Figura 4: Efeito da exposição à nicotina em ratas lactantes sobre o conteúdo das proteínas D2R, OBRb, pJAK2, pSTAT3, SOCS3, NPY e POMC no núcleo arqueado (ARC).

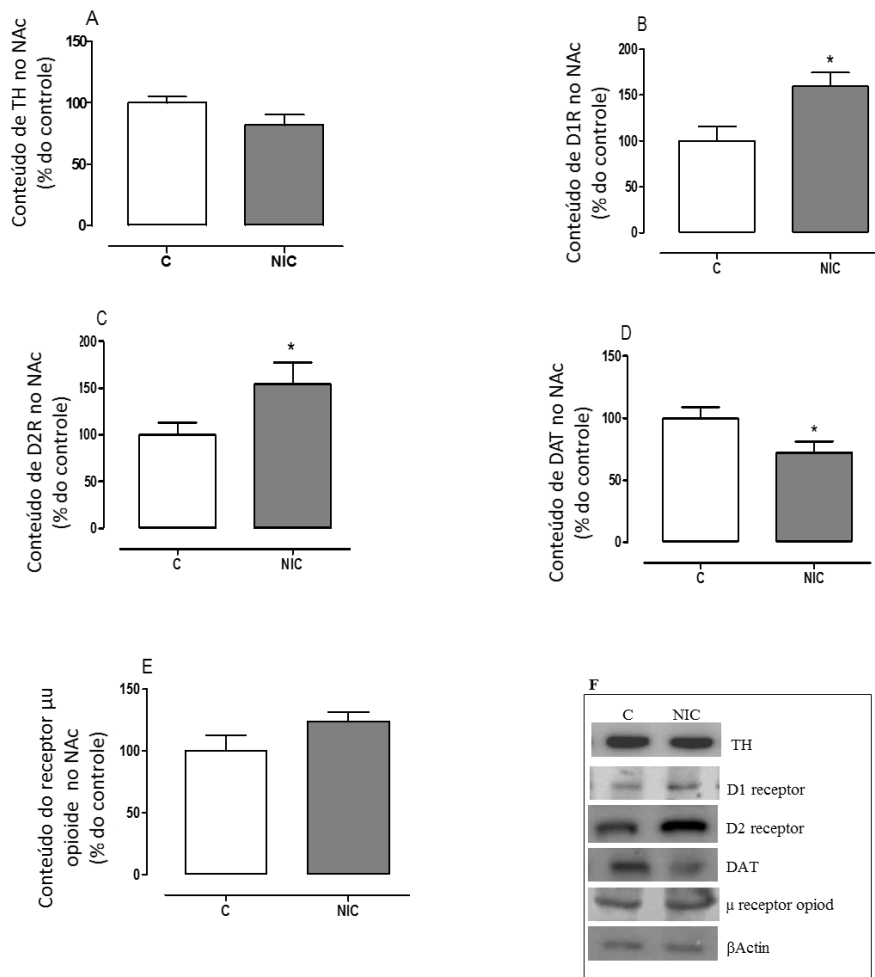


Legenda: Conteúdo de TH (A), OBRb (B), pJAK2 (C), pSTAT3 (D), SOCS3 (E), NPY (F) e POMC (G) no ARC das ratas lactantes que receberam nicotina ou salina durante a lactação. As bandas representam o conteúdo das proteínas no ARC individualmente das ratas C e NIC (H). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; NIC: grupo nicotina. * P < 0,05.

3.2 Efeitos da exposição à nicotina sobre o sistema dopaminérgico e ARC da prole em PN15

Foi observado maior conteúdo de D1R (+ 60%, $p < 0,05$, fig. 6B) e D2R (+ 54%, $p < 0,05$, fig. 5C), menor conteúdo de DAT (-28%, $p < 0,05$, fig. 5D) no NAC, da prole NIC em PN15 quando comparado ao grupo controle. Conteúdo de TH e receptor μ opióide (figs. 5A e 5E, respectivamente) não diferiu entre os grupos.

Figura 5: Efeito da exposição neonatal à nicotina nas proles aos 15 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT e receptor μ opióide no núcleo accumbens (NAC).

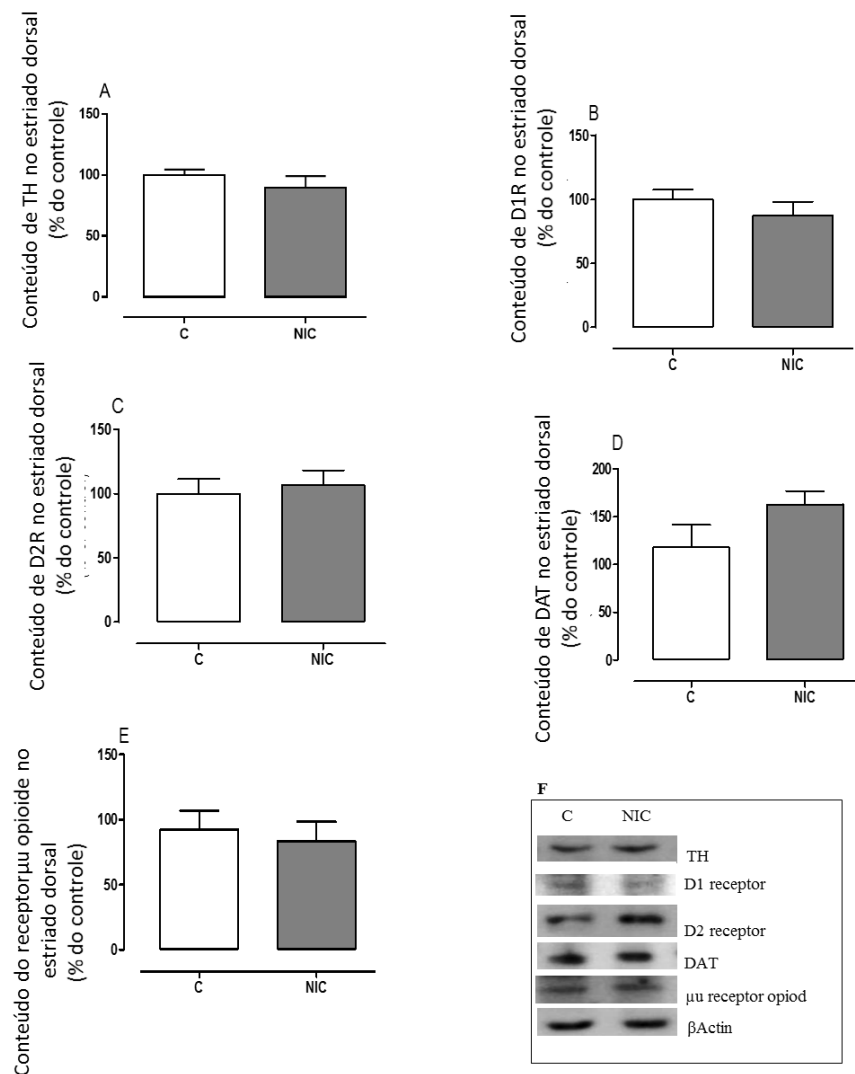


Legenda: Conteúdo de TH (A), D1R (B), D2R (C), DAT (D) e receptor μ opióide (E) no Nac das proles em PN15 cujas mães receberam nicotina ou salina em PN2-PN15. As bandas representam o conteúdo das proteínas no Nac individualmente das proles C e NIC (F). Conteúdo de actina foi utilizado como

controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; NIC: grupo nicotina. * P < 0,05.

A prole NIC não apresentou nenhuma alteração no conteúdo de TH, D1R, D2R, DAT e receptore μ opióide quando comparado com a prole C no DS (fig. 6).

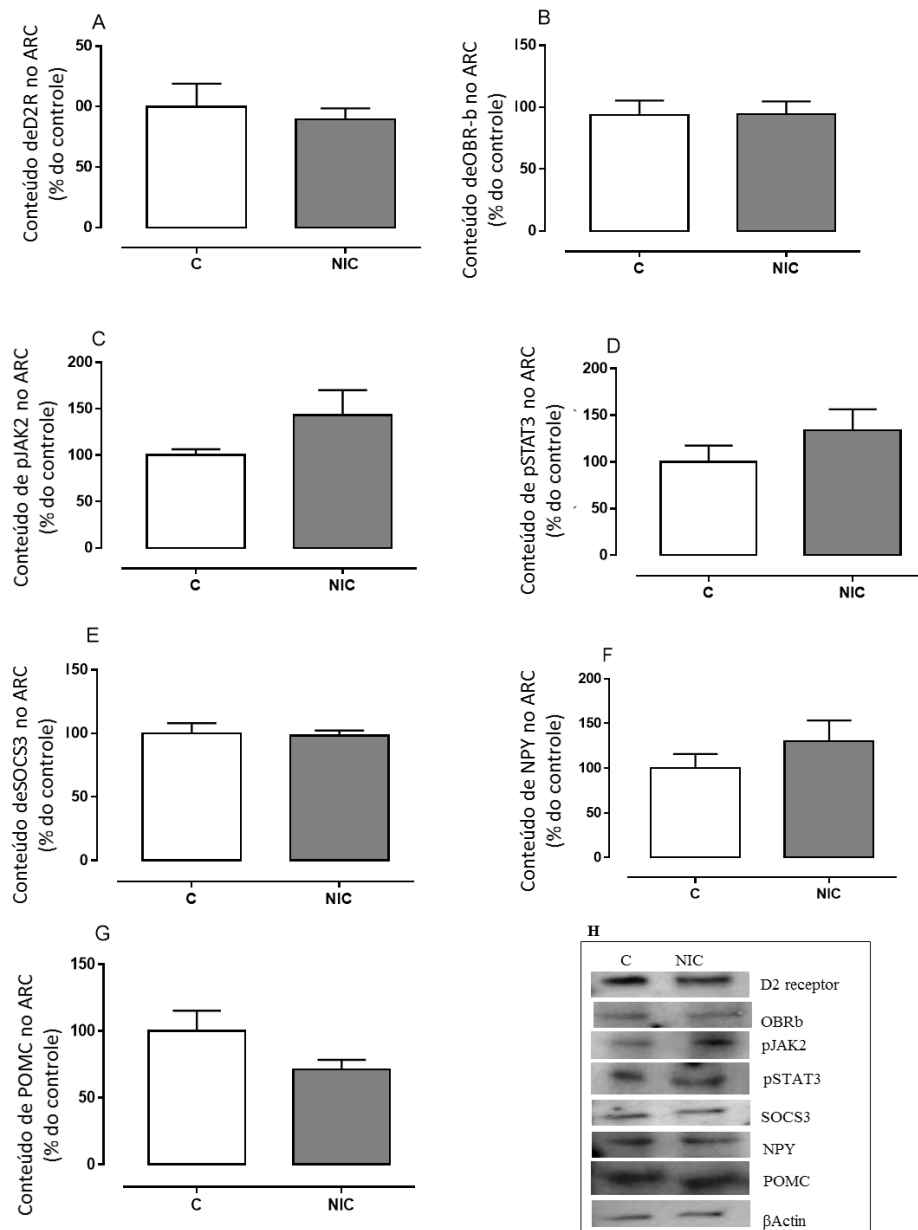
Figura 6: Efeito da exposição neonatal à nicotina nas proles aos 15 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT e receptor μ opióide no estriado dorsal (DS).



Legenda: Conteúdo de TH (A), D1R (B), D2R (C), DAT (D) e receptor μ opióide (E) no DS das proles em PN15 cujas mães receberam nicotina ou salina em PN2-PN15. As bandas representam o conteúdo das proteínas no DS individualmente das proles C e NIC (F). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; NIC: grupo nicotina.

No ARC (fig. 7), não observamos diferença significativa no conteúdo das proteínas avaliadas entre os grupos (D2R, OBRb, pJAK2, pSTAT3, SOCS3, NPY e POMC).

Figura 7: Efeito da exposição neonatal à nicotina nas proles aos 15 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas D2R, OBR-b, pJAK2, pSTAT3, SOCS3, NPY e POMC no núcleo arqueado (ARC).



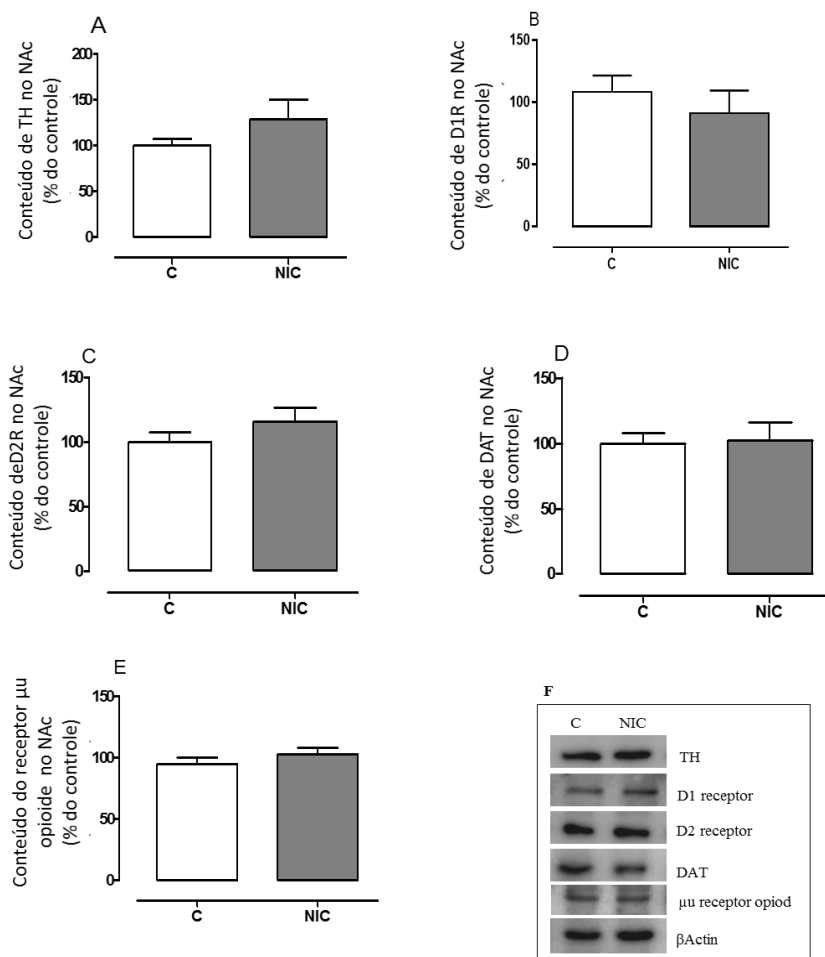
Legenda: Conteúdo de D2R (A), OBR-b (B), pJAK2 (C), pSTAT3 (D) SOCS3 (E), NPY (F) e POMC (G) no ARC das proles em PN15 cujas mães receberam nicotina ou salina em PN2-PN15. As bandas representam o conteúdo das proteínas no ARC individualmente das proles C e NIC (H). Conteúdo de

actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; NIC: grupo nicotina.

3.3 Efeitos da exposição à nicotina sobre o sistema dopaminérgico e ARC da prole em PN21

No NAc (fig. 8), não verificamos diferenças no conteúdo das proteínas avaliadas entre os animais NIC e C em PN21.

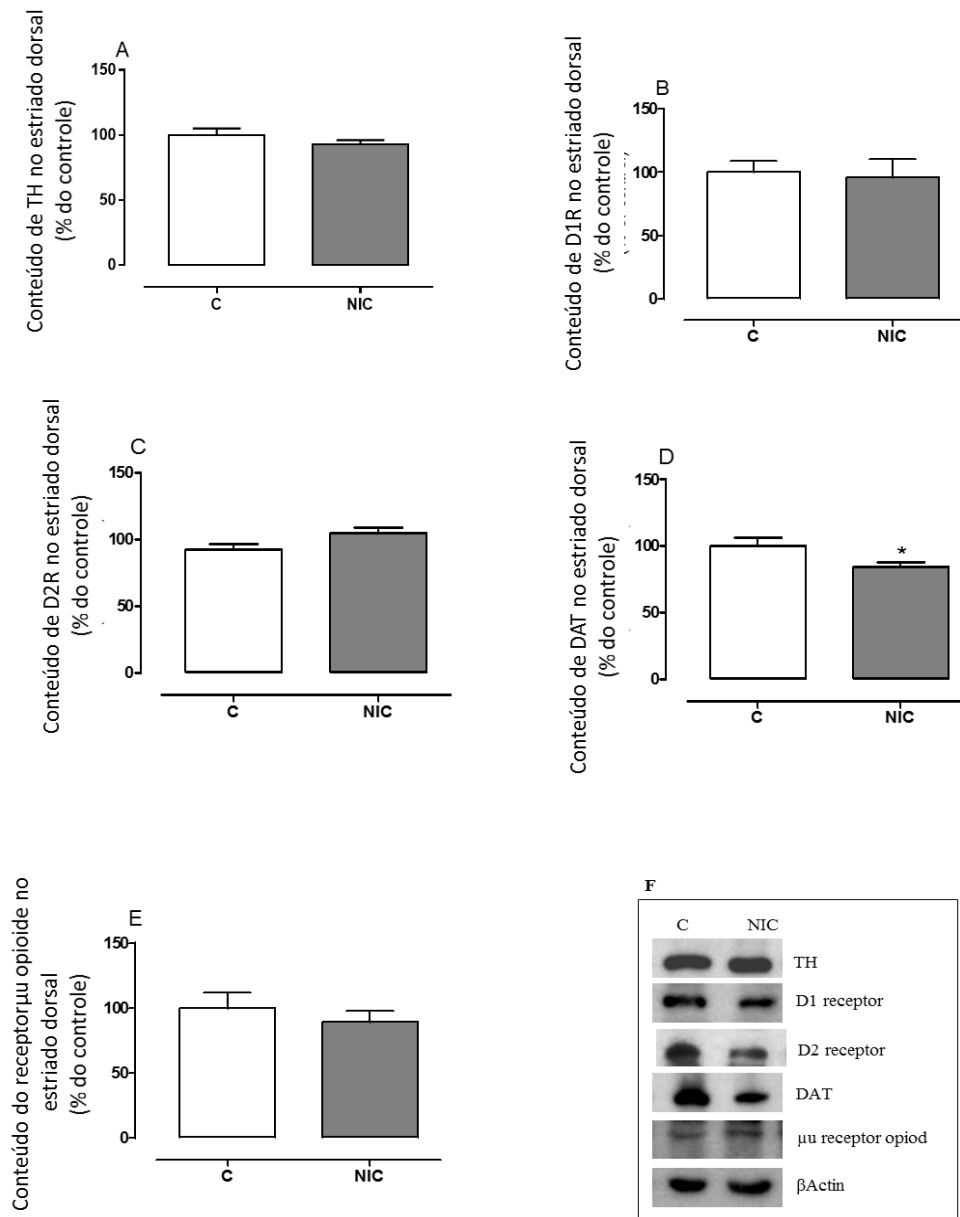
Figura 8: Efeito da exposição neonatal à nicotina nas proles aos 21 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT e receptor μ opióide no núcleo accumbens (NAc).



Legenda: Conteúdo de TH (A), D1R (B), D2R (C), DAT (D) e receptor μ opióide (E) no NAc das proles em PN21 cujas mães receberam nicotina ou salina em PN2-PN15. As bandas representam o conteúdo das proteínas no NAc individualmente das proles C e NIC (F). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; NIC: grupo nicotina.

No DS, dentre as proteínas avaliadas, observamos apenas menor conteúdo de DAT (-16%, $p < 0,05$, fig. 9D) no grupo NIC.

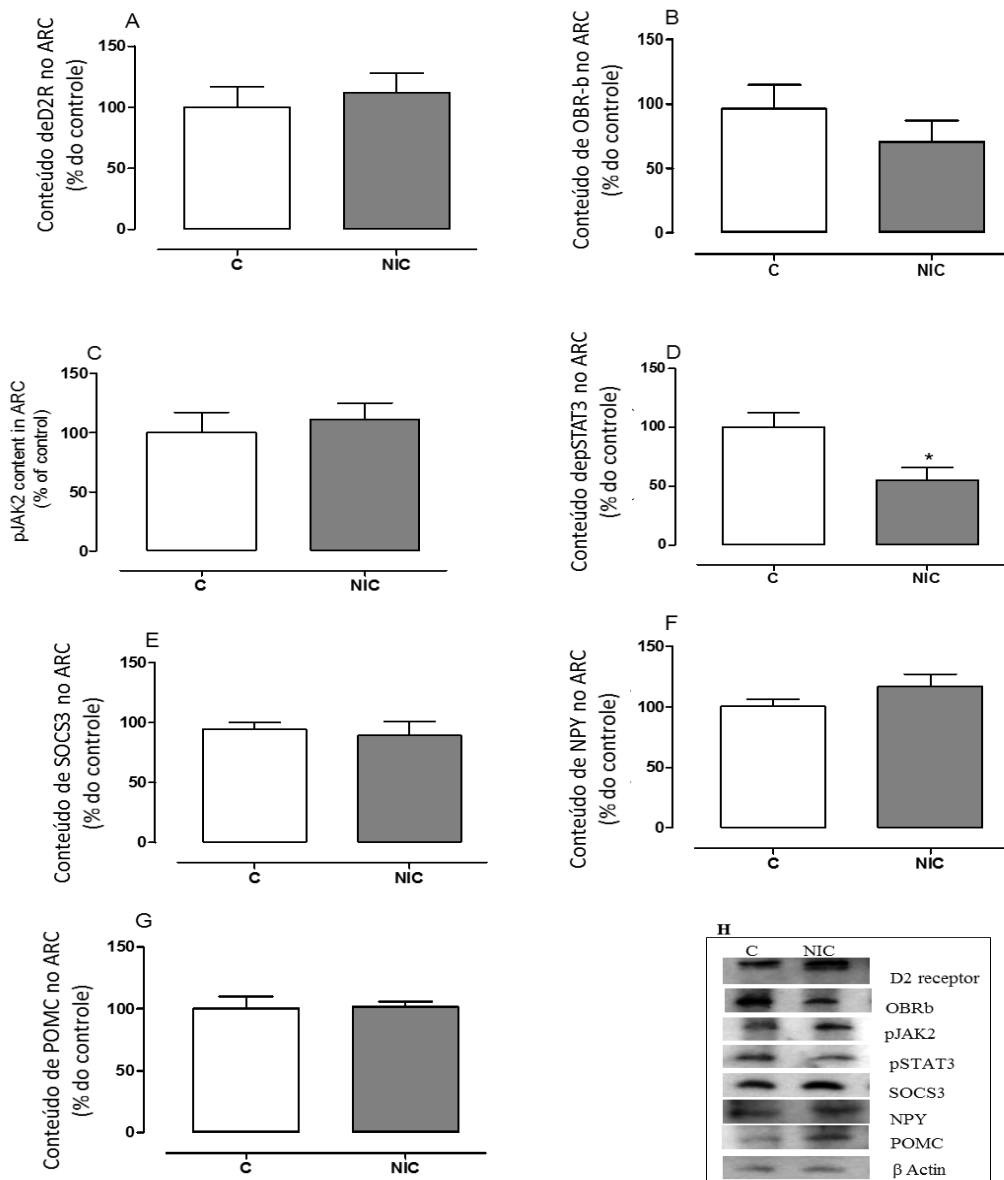
Figura 9: Efeito da exposição neonatal à nicotina nas proles aos 21 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, D1R, D2R, DAT e receptor μ opióide no estriado dorsal (DS).



Legenda: Conteúdo de TH (A), D1R (B), D2R (C), DAT (D) e receptor μ opióide (E) no DS das proles em PN21 cujas mães receberam nicotina ou salina em PN2-PN15. As bandas representam o conteúdo das proteínas no DS individualmente das proles C e NIC (F). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; NIC: grupo nicotina. *P<0,05.

No ARC a prole NIC apresentou menor conteúdo de pSTAT3 (-45%, p <0,05, fig. 10D) quando comparada com as proles controles.

Figura 10: Efeito da exposição neonatal à nicotina nas proles aos 21 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas D2R, OBR-b, pJAK2, pSTAT3, SOCS3, NPY e POMC no núcleo arqueado (ARC).

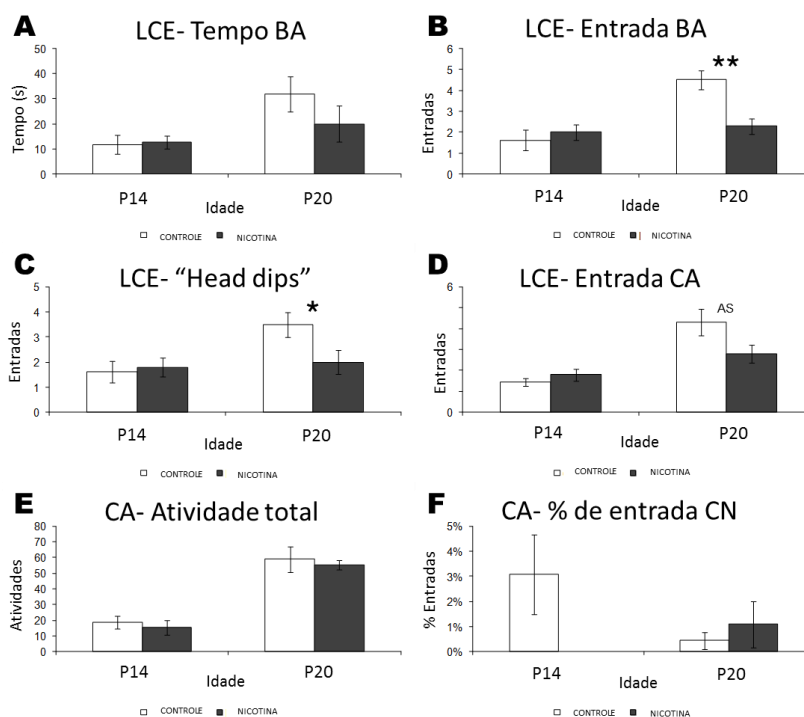


Legenda: Conteúdo de D2R (A), OBR-b (B), pJAK2 (C), pSTAT3 (D) SOCS3 (E), NPY (F) e POMC (G) no ARC das proles em PN21 cujas mães receberam nicotina ou salina em PN2-PN15. As bandas representam o conteúdo das proteínas no ARC individualmente das proles C e NIC (H). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; NIC: grupo nicotina. *P<0,05.

3.4 Efeitos da exposição à nicotina sobre o comportamento da prole em PN14 e PN20

No LCE, o tratamento significativo \times interação da idade foram observados para as variáveis entradas no BA (F = 9,4, df = 1, p = 0,004), as entradas no CA (F = 4,6, df = 1, p = 0,039) e “head dips” (F = 3,4, df = 1, p = 0,079). Como resultado, as análises posteriores foram realizadas separadamente para cada idade. Tal como indicado nas figs. 11B e 11C, os animais expostos à nicotina apresentaram em PN20 uma redução em ambas as entradas BA (F = 14,2, df = 1, p = 0,001) e “head dips” (F = 4,8, df = 1, p = 0,043), quando comparados ao grupo controle. A redução na atividade locomotora, tal como medida pelo parâmetro de entradas no CA (Fig. 11D), os animais expostos à nicotina aproximaram da significância (F = 3,8, df = 1, p = 0,068) em PN20. Em relação aos comportamentos no CA, não observamos diferença entre os grupos em qualquer idade para atividade total (Fig. 11E), bem como para as % de entradas no CN (dados não mostrados).

Figura 11. Efeitos da exposição neonatal à nicotina sobre o comportamento no labirinto em cruz elevado e no campo aberto.



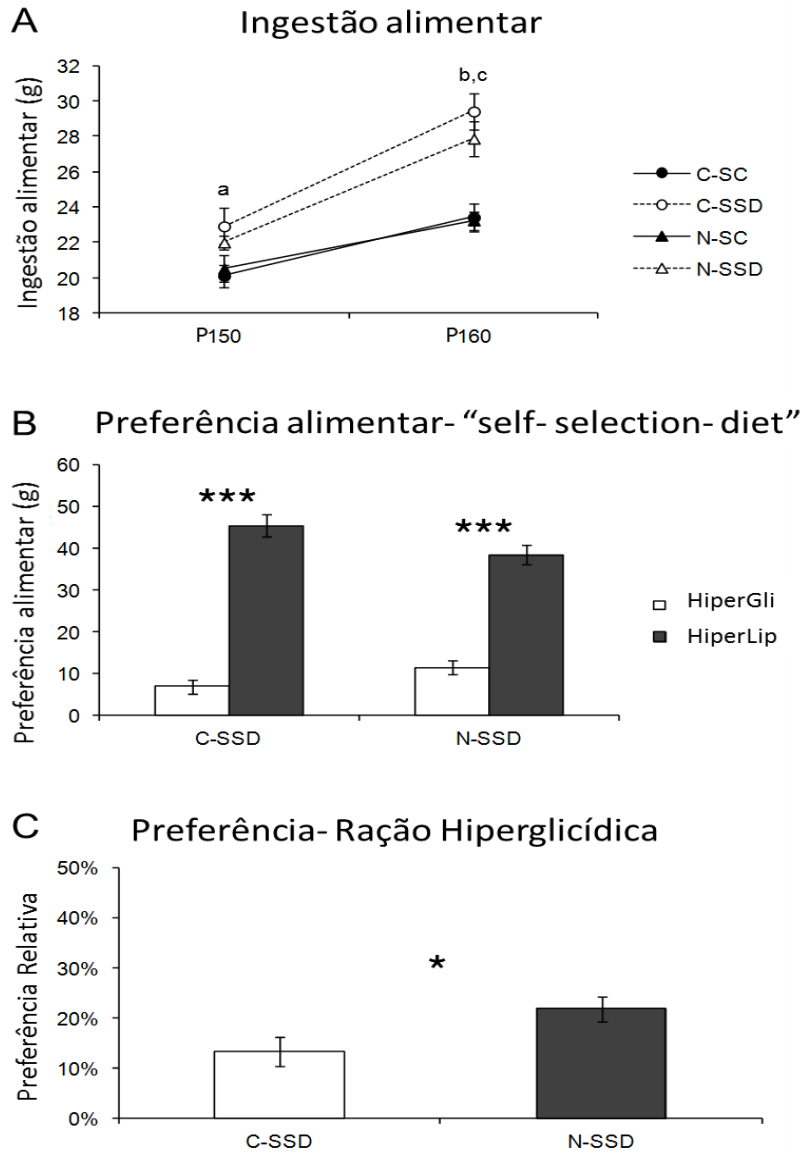
Legenda: Comportamento Ansiedade- como medida pelo tempo BA (A) e as entradas BA (B) no LCE; atividade locomotora medida pela % Tempo CN (C); atividade locomotora, tal como medido por entradas no CA (D). A atividade total no campo aberto foi quantificada através do número de retângulos cruzados (E); comportamento semelhante a ansiedade como medida pela % de Atividade no CN no CA (F). Os valores foram expressos como médias \pm SEM. AS $0.10 > p \geq 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p > 0.01$.

3.5- Efeito da exposição materna à nicotina sobre o consumo de alimentos e da preferência alimentar após 12 h de jejum

Em relação ao consumo total de ração, o rANOVA indica significativa interação Grupo \times Dia ($F = 4,7$, $df = 3$, $p = 0,05$). Comparações pareadas indicaram que a ingestão alimentar, quer quando se considera a ração padrão ou as duas dietas (hiperglicídica e hiperlipídica) utilizadas para a “self selection diet”, não foi afetada pela exposição à nicotina. No entanto, os animais controles, que podiam auto-selecionar suas dietas (C-SSD) apresentaram maior ingestão alimentar do que aqueles que tinham acesso apenas a ração padrão (C-SC), tanto em P150 (+ 14%, $p = 0,012$) quanto em P160 (+ 26%, $p < 0,001$) (fig. 12A). Tal como para os animais nicotina, aqueles que podiam auto-selecionar consumiram significativamente mais (+ 20%, $p < 0,001$) do que aqueles que receberam apenas a ração padrão, no entanto a diferença significativa ocorreu apenas em P160 (fig. 12A).

Em relação a preferência alimentar exclusivamente dos grupos que recebiam as dietas palatáveis, controle e nicotina SSD, interação significativa grupo \times conteúdo da dieta ($F = 4,3$, $df = 1$, $p = 0,049$) foi observada. As análises de Pairwise indicaram que tanto o grupo controle ($t = 9,5$, $p < 0,001$) quanto nicotina ($t = 7,1$, $p < 0,001$) preferiram a dieta hiperlipídica (fig. 12B). Tal como indicado na fig. 12C, animais do grupo nicotina apresentaram preferência de 63% a mais para a ração hiperglicídica do que os animais do grupo controle. A ingestão calórica total (Kcal) não diferiu entre os animais do grupo C-SSD ($124,9 \pm 4,098$) e N-SSD ($119,4 \pm 2.378$).

Figura 12. Efeito da exposição neonatal à nicotina sobre a ingestão e preferência alimentar.



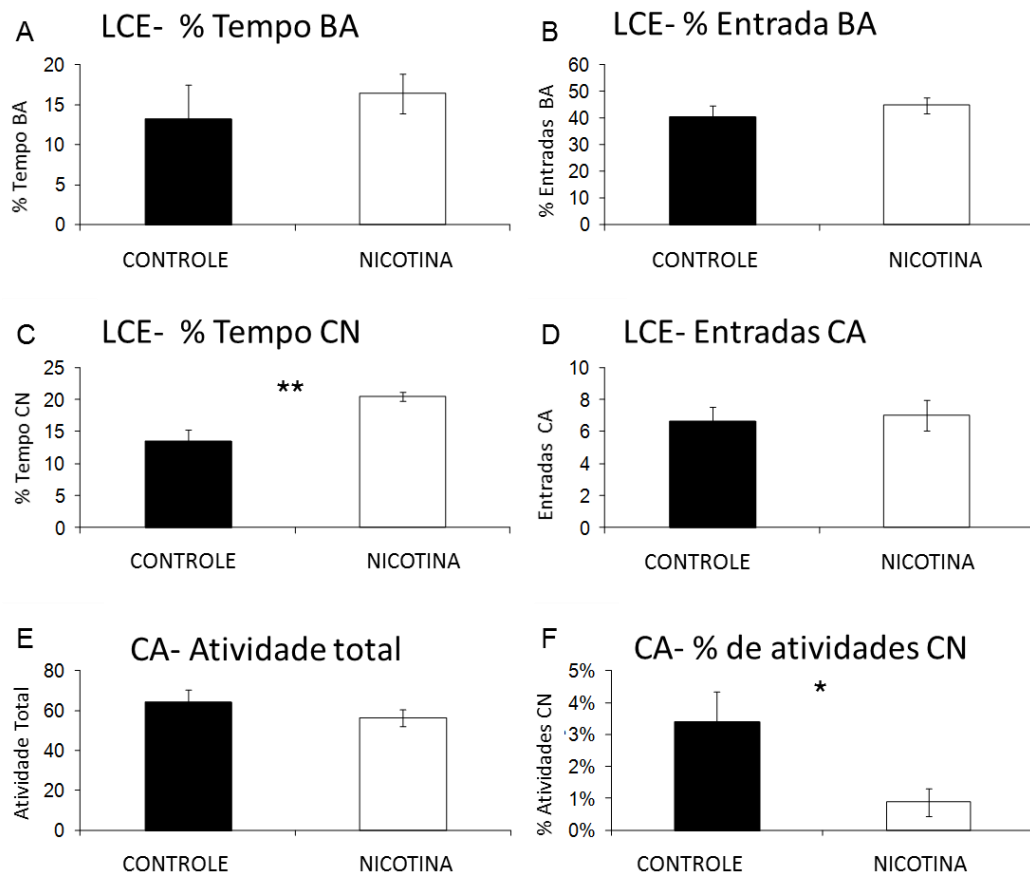
Legenda:A) O consumo total alimentar (em gramas) em cada um dos grupos em P150 e P160. B) As preferências alimentares, medida pelo consumo das rações HiperGLI ou HiperLIP nos grupos controle e nicotina. C) preferência relativa para a ração HiperGLI. A e B: Os valores expressos como média \pm SEM. C: Valores expressos como preferência relativa \pm SEM. C: grupo controle; N: grupo nicotina; SC: dieta de ração padrão; SSD: dieta “self-selection diet”. a = C-C-SC \times SSD: $p < 0,05$, b = C-C-SC \times SSD: $p < 0,001$, c = N-SC \times N-SSD: $p < 0,001$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

3.6- Efeito da exposição materna à nicotina sobre o comportamento

No LCE, como indicado nas figs. 13A e B, a exposição à nicotina durante a lactação não afetou os parâmetros semelhante a ansiedade (% Tempo BA e % Entradas BA) nos animais adultos. A atividade locomotora, tal como medida pelo parâmetro de entradas no CA (fig. 2D) também não foi afetada pela exposição precoce à nicotina. Por outro lado, o parâmetro % Tempo CN (fig. 13C) foi significativamente ($F = 14,2$, $df = 1$, $p = 0,002$) maior nos animais expostos à nicotina.

No CA, a atividade locomotora, tal como indicado pelo número total de quadrados que foram cruzados (+ 51%, fig. 13E), não foi afetada pela exposição à nicotina. No entanto, a exposição precoce à nicotina diminuiu significativamente ($F = 5,6$, $df = 1$, $p = 0,024$) a variável de % atividade no CN (-74%, fig. 13F).

Figura 13. Efeito da exposição neonatal à nicotina sobre o comportamento no labirinto em cruz elevado e nos testes de campo aberto.

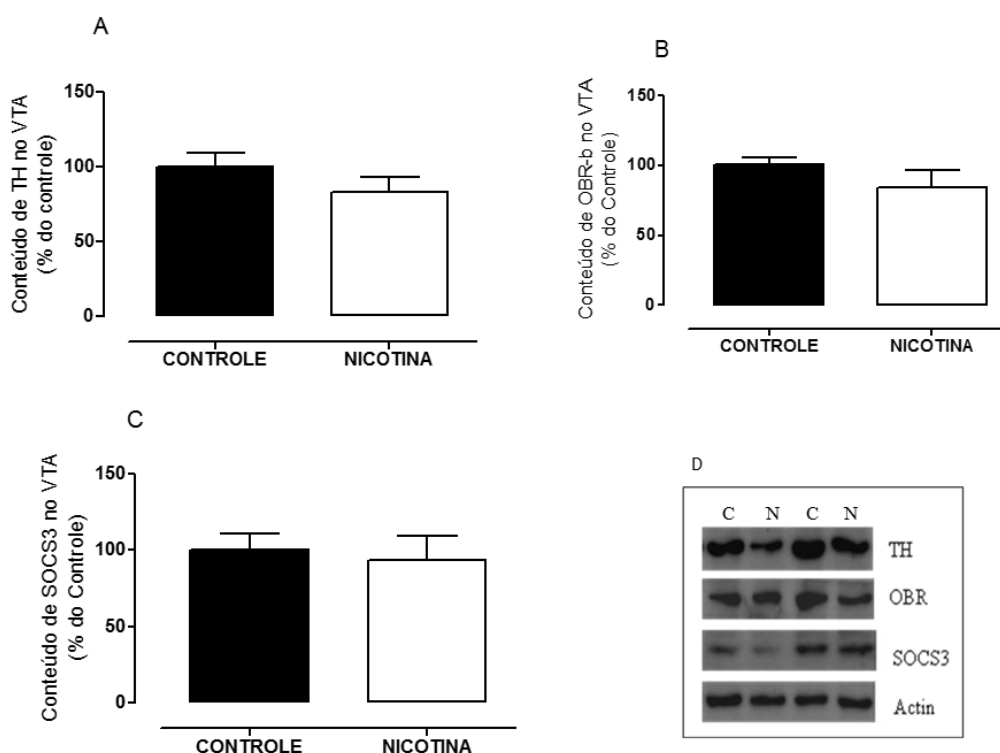


Legenda: Comportamento semelhante a ansiedade, conforme medido por % Tempo BA (A) e % entradas BA (B) do LCE; a tomada de decisão, conforme medido por % Tempo CN (C); atividade locomotora, tal como medida por entradas CA (D). A atividade total no campo aberto foi quantificada através do número de retângulos cruzados (E); comportamento semelhante à ansiedade medida pela % de Atividade CN no CA (F). Os valores foram expressos como médias \pm SEM. * $P < 0,05$, ** $p > 0,01$.

3.7- Efeito da exposição materna à nicotina sobre o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico

Em PN170, a prole N não apresentou alterações no conteúdo de TH, OBRb e SOCS3 no VTA quando comparado a prole C (fig. 14).

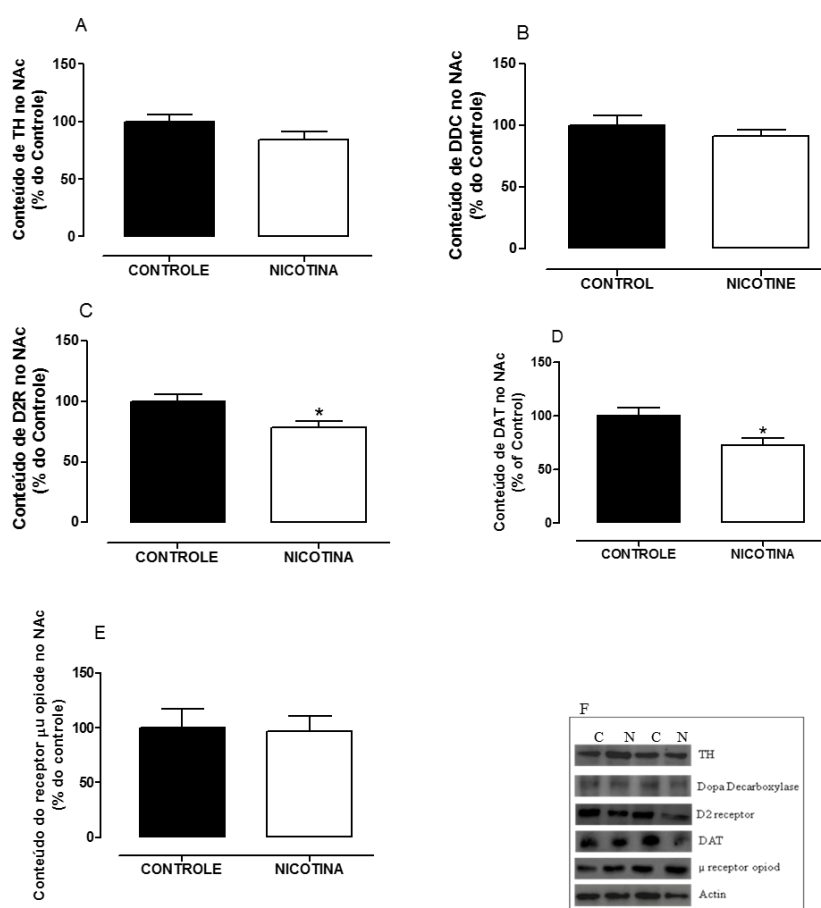
Figura 14: Efeito da exposição materna à nicotina nas proles aos 170 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, OBRb, e SOCS3 na area tegmentar ventral (VTA).



Legenda: Conteúdo de TH (A), OBRb (B), e SOCS3 (C) no VTA das proles adultas cujas mães receberam nicotina ou salina durante a lactação. As bandas representam o conteúdo das proteínas no VTA individualmente dos animais C e NIC (D). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; N: grupo nicotina.

Em relação ao Nac, as proles do grupo N não apresentaram alteração no conteúdo de TH, DDC e no receptor μ opióide (figs. 15A, B e E, respectivamente). No entanto, eles exibiram menor conteúdo de D2R (-22%, $p < 0,05$, fig. 15C) e DAT (-28%, $p < 0,05$, fig. 15D) em comparação com os animais C.

Figura 15: Efeito da exposição materna à nicotina nas proles aos 170 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, DDC, D2R, DAT e receptor μ opióide no núcleo accumbens (NAc).

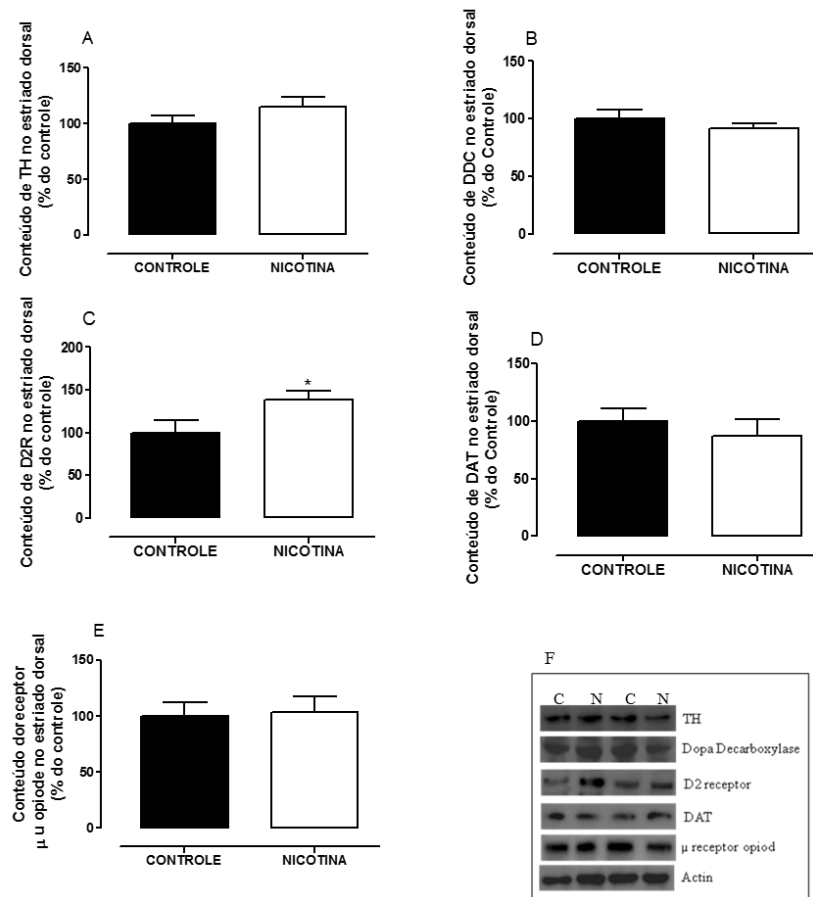


Legenda: Conteúdo de TH (A), DDC (B), D2R (C), DAT (D) e receptor μ opióide (E) no NAc das proles adultas cujas mães receberam nicotina ou salina durante a lactação. As bandas representam o conteúdo das proteínas no NAc individualmente dos animais C e N (D). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM ($n = 7$ por grupo). C: grupo controle; N: grupo nicotina. * $p < 0,05$.

No DS, as proles adultas do grupo N apresentaram apenas maior conteúdo de D2R (+39%, $p < 0,05$, fig. 16C) que a prole C. Não houve alteração no conteúdo de TH, DDC, DAT e

receptor μ opióide no grupo N em comparação com o grupo C (figs. 16A, B, D e E, respectivamente).

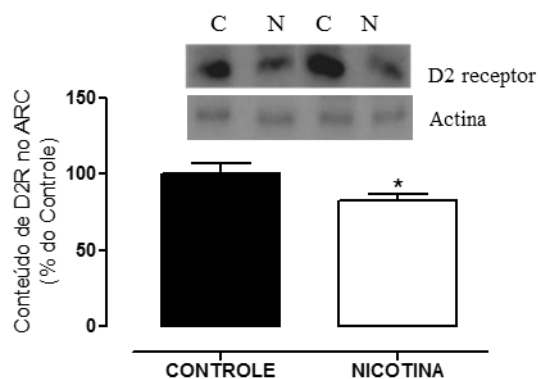
Figura 16: Efeito da exposição materna à nicotina nas proles aos 170 dias de idade sobre o conteúdo das proteínas TH, DDC, D2R, DAT e receptor μ opióide no estriado dorsal (DS).



Legenda: Conteúdo de TH (A), DDC (B), D2R (C), DAT (D) e receptor μ opióide (E) no DS das proles adultas cujas mães receberam nicotina ou salina durante a lactação. As bandas representam o conteúdo das proteínas no DS individualmente dos animais C e N (D). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; N: grupo nicotina. *p < 0,05.

No ARC, o grupo N apresentou menor conteúdo de D2R quando comparado com o grupo C (-17%, p < 0,05, fig. 17).

Figura 17: Efeito da exposição materna à nicotina nas proles aos 170 dias de idade sobre o conteúdo da proteína D2R no núcleo arqueado (ARC).



Legenda: Conteúdo de D2R no ARC das proles adultas cujas mães receberam nicotina ou salina durante a lactação. As bandas representam o conteúdo das proteínas no ARC individualmente dos animais C e N. Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; N: grupo nicotina. *p<0,05.

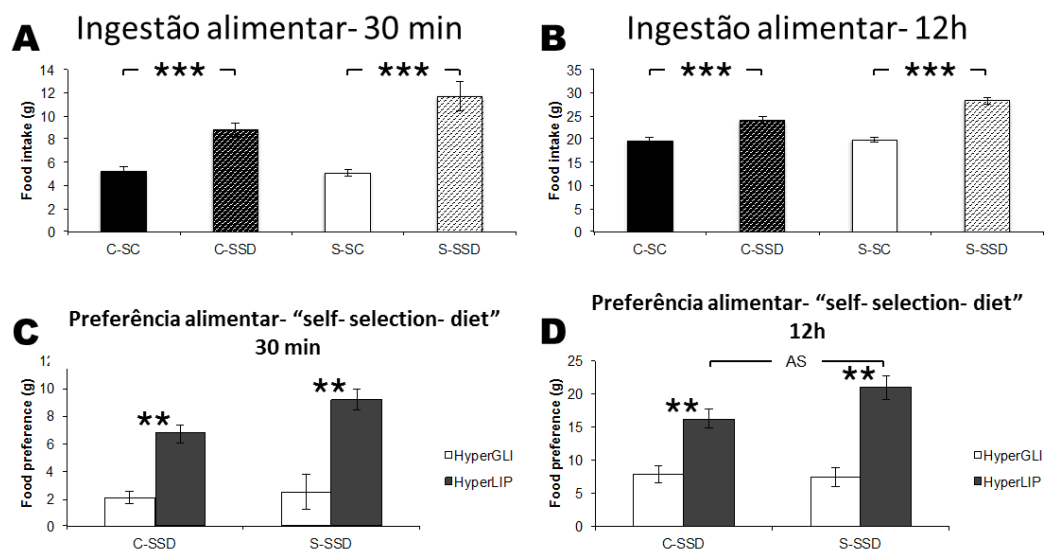
3.8 Efeito da exposição à fumaça do tabaco sobre o consumo e a preferência alimentar após 12 h de jejum

Em relação ao consumo total de ração, o teste estatístico de mANOVA indicou interação significativa do grupo \times dieta tanto para o período de 30 min (F = 5,8, df = 1, p = 0,022) quanto para 12 h (F = 8,8, df = 1, p = 0,005). As comparações por Pairwise indicaram que os animais SSD ingeriram mais do que os SC tanto o grupo controle (+ 68%; FPLSD: p < 0,001) como no grupo exposto precocemente à fumaça do cigarro (+ 131%; FPLSD: p < 0,001) após 30 min (Fig 18A). O mesmo padrão de resultados foi observado para o período de 12 h (controle: + 22%; FPLSD: p < 0,001; fumaça: + 43%; FPLSD: p < 0,001) (fig 18B). Além disso, os animais SSD expostos precocemente à fumaça do cigarro, também ingeriram mais do que o grupo controle SSD, tanto em 30 min (+ 33%; FPLSD: p = 0,004) quanto em 12 h (+ 18%; FPLSD: p = 0,001).

Quanto a preferência alimentar exclusivamente nos grupos “self selection diet”, ambos controle e fumaça, efeito significativo foi observado em ambos períodos de 30 min e 12h. Aos 30 min, foram observados efeitos de Grupo (F = 39,2, df = 1, p < 0,001) e conteúdo da dieta (F = 5,7, df = 1, p = 0,029). As análises de Pairwise indicaram que tanto os animais do grupo controle (t = 4,8, p < 0,001) quanto do grupo fumaça (t = 3,9, p = 0,008), preferiram a dieta hiperlipídica (fig. 18C). Quanto ao período de 12 h, os efeitos de Grupo (F = 15,6, df = 1, p = 0,001) e conteúdo da dieta (F = 27,7, df = 1, p < 0,001) também foram observados. Novamente, análises de Pairwise indicaram que tanto os animais do grupo controle (t = 3,2, p

= 0,008) quanto do grupo fumaça ($t = 4,3$, $p = 0,005$) preferiram a dieta hiperlipídica (fig. 18D). Além disso, as proles do grupo fumaça ingeriram mais ração hiperlipídica (+ 37%; $F = 5,4$, $df = 1$, $p = 0,032$) do que o grupo controle, após 30 min (fig 18C.). A diferença aproximou-se de significância no período de 12 h (+ 29%; $F = 4,1$, $df = 1$, $p = 0,058$) (Fig 18D). Não foram observadas diferenças em relação à dieta hiperglicídica.

Figura 18. Efeitos da exposição neonatal ao fumo do tabaco na ingestão e preferência alimentar.

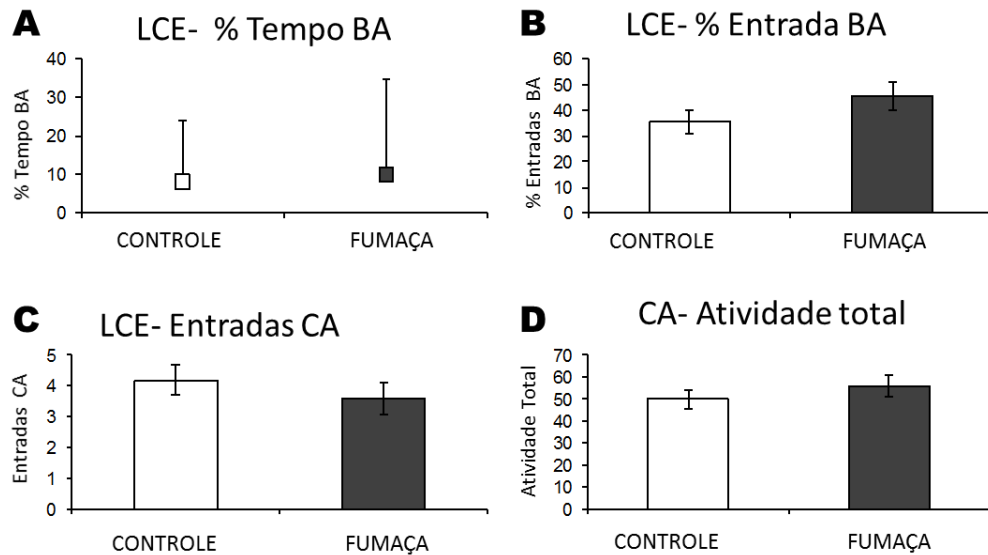


Legenda: A ingestão total de alimento (em gramas) em cada um dos grupos em P175 durante intervalo de 30 min (A), ou 12 h (B). Preferência alimentar, medida pelo consumo de HiperGLI ou HiperLIP em ambos os grupos controle e fumaça em P175 durante intervalo de 30 min (C) ou 12 h (D). Valores expressos em média \pm SEM. C: grupo controle; S: grupo fumaça; SC: dieta de ração padrão; SSD: dieta "self-selection diet". $0,10 < AS \leq 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.9 Efeito da exposição à fumaça do tabaco sobre o comportamento no labirinto em cruz elevado e no campo aberto.

No teste do LCE, não foram observadas diferenças entre os grupos quanto aos níveis de ansiedade, medida pela % de tempo no BA (fig. 19A) e % de Entradas no BA (fig. 19B). A Atividade locomotora (entradas CA) também não mostrou efeitos significativos (fig. 19C). No teste do CA, não foi observada diferença entre os grupos quanto à atividade total (CN + P, fig 19D), e atividade no centro, medida pelo tempo (MW: $Z = - 0,3$, $p = 0,708$) e % de entradas no CN (PM: $Z = - 0,4$, $p = 0,675$) no centro do equipamento (dados não mostrados).

Figura 19. Efeitos da exposição neonatal à fumaça do tabaco sobre o comportamento no labirinto em cruz elevado e no campo aberto.

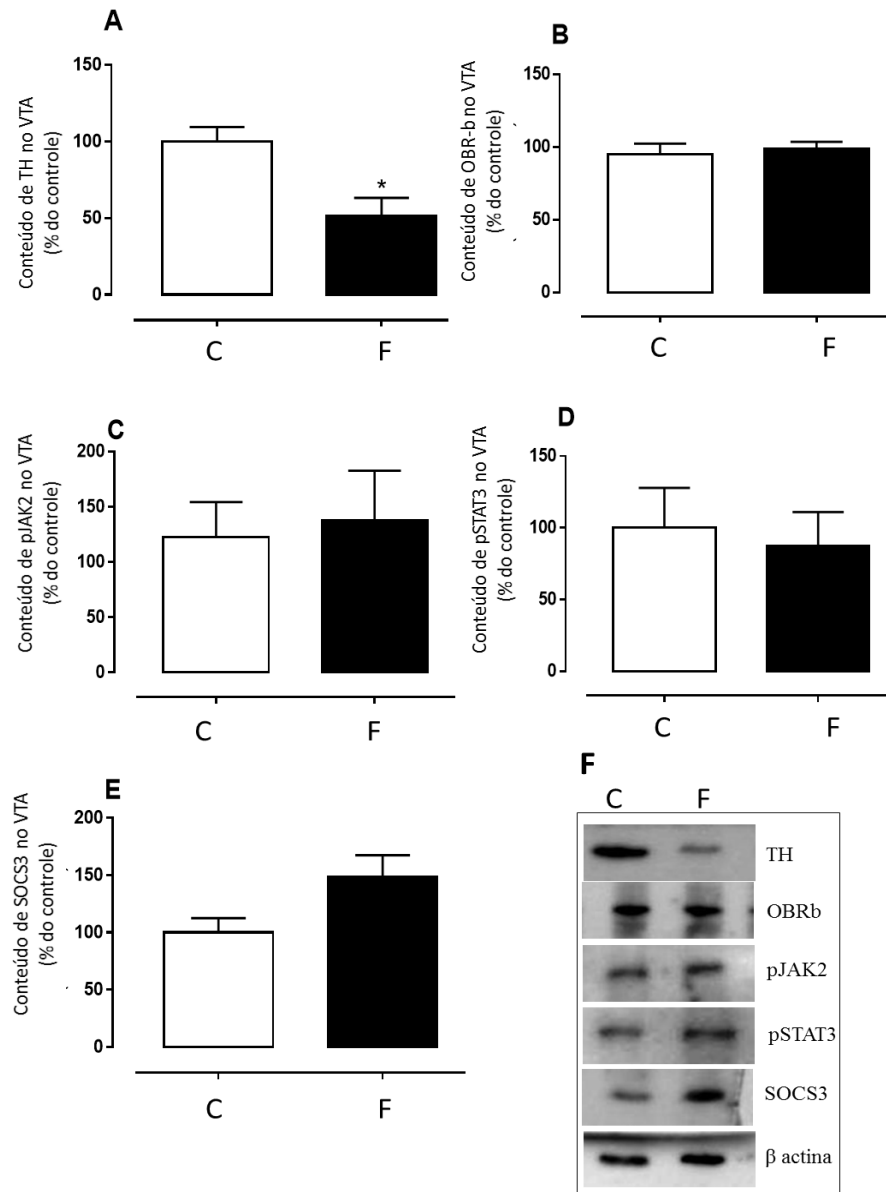


Legenda: Comportamento semelhante a ansiedade, medido por % Tempo no BA (A) e % entradas no BA (B) do LCE; atividade locomotora medida por entradas no CA (C) do LCE). A atividade total no campo aberto foi quantificada através do número de retângulos deambulados (D). Os valores são médias \pm SEM em B, C e D. Os valores são medianas \pm intervalo interquartil em A.

3.10 Efeitos da exposição à fumaça do tabaco sobre o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico

Em PN180, as proles fumaça (F) apresentaram menor conteúdo de TH (-49%, $t = 3,07$, $p < 0,05$, fig 20A) de no VTA quando comparados com as proles C, sem alterações no conteúdo de OBRb, pJAK2, PSTAT3 e SOCS3 (figs 20B, 20C, 20D e 20E, respectivamente).

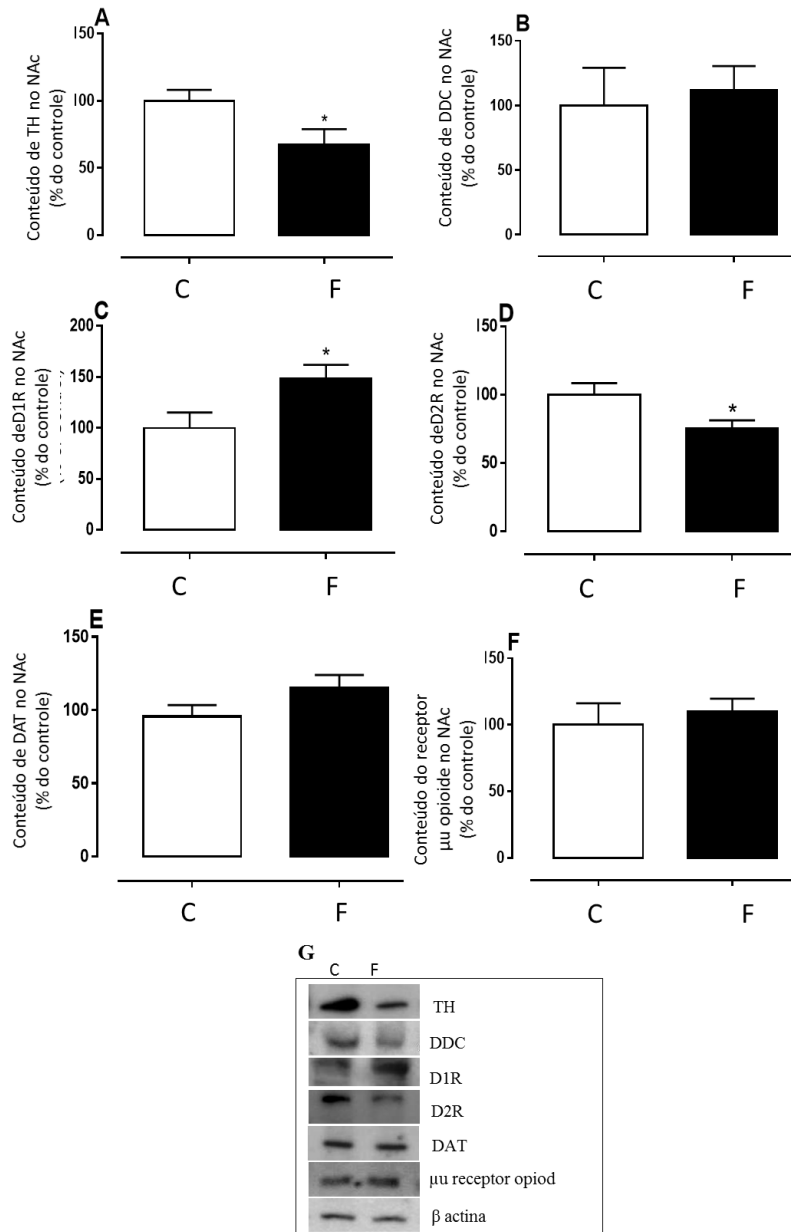
Figura 20: Efeitos da exposição neonatal ao fumo do tabaco no conteúdo das proteínas TH e da via de sinalização da leptina na area tegmentar ventral (VTA).



Legenda: Conteúdo de TH (A), OBRb (B), pJAK2 (C), pSTAT3 (D) e SOCS3 (E) no VTA da prole em PN180. As bandas representam o conteúdo das proteínas no VTA individualmente dos animais C e F (F). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; F: grupo fumaça. * P < 0,05.

No NAc, as proles F apresentaram menor conteúdo de TH (-33%, $t = 2,36$, $p < 0,05$, fig. 21A), maior D1R (+ 49%, $t = 2,40$, $p < 0,05$, fig. 21B) e menor D2R (- 25%, $t = 2,43$, $p < 0,05$, fig 21C) comparado com o grupo C, embora sem alterações no conteúdo de DAT e receptor μ de opióide (fig. 21D e 21E fig., respectivamente).

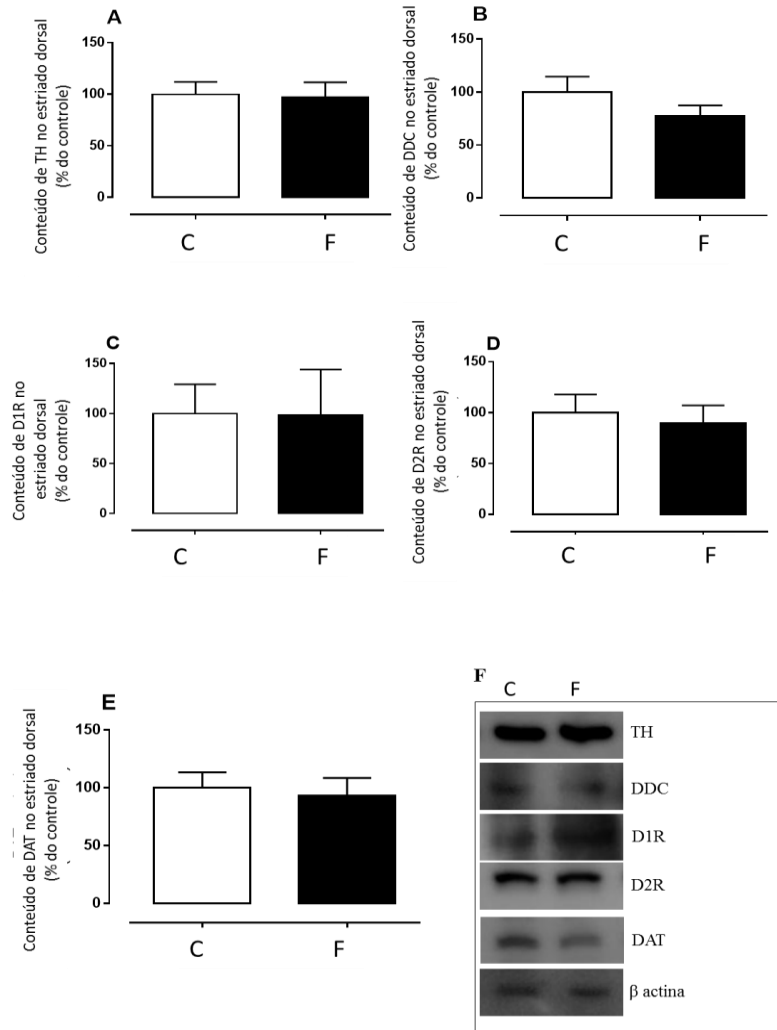
Figura 21: Efeitos da exposição neonatal ao fumo do tabaco no conteúdo das proteínas TH, DDC, D1R, D2R, DAT e receptor μ de opióide no núcleo accumbens (NAC).



Legenda: Conteúdo de TH (A), DDC (B), D1R (C), D2R (D) DAT (E) e receptor opióide μ (F) no NAc das proles em PN180. As bandas representam o conteúdo das proteínas no NAc individualmente dos animais C e F (G). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; F: grupo fumaça. * P < 0,05.

No DS, não observamos mudanças no conteúdo em todas as proteínas avaliadas, TH, D1R, D2R e DAT (fig. 22) entre os grupos.

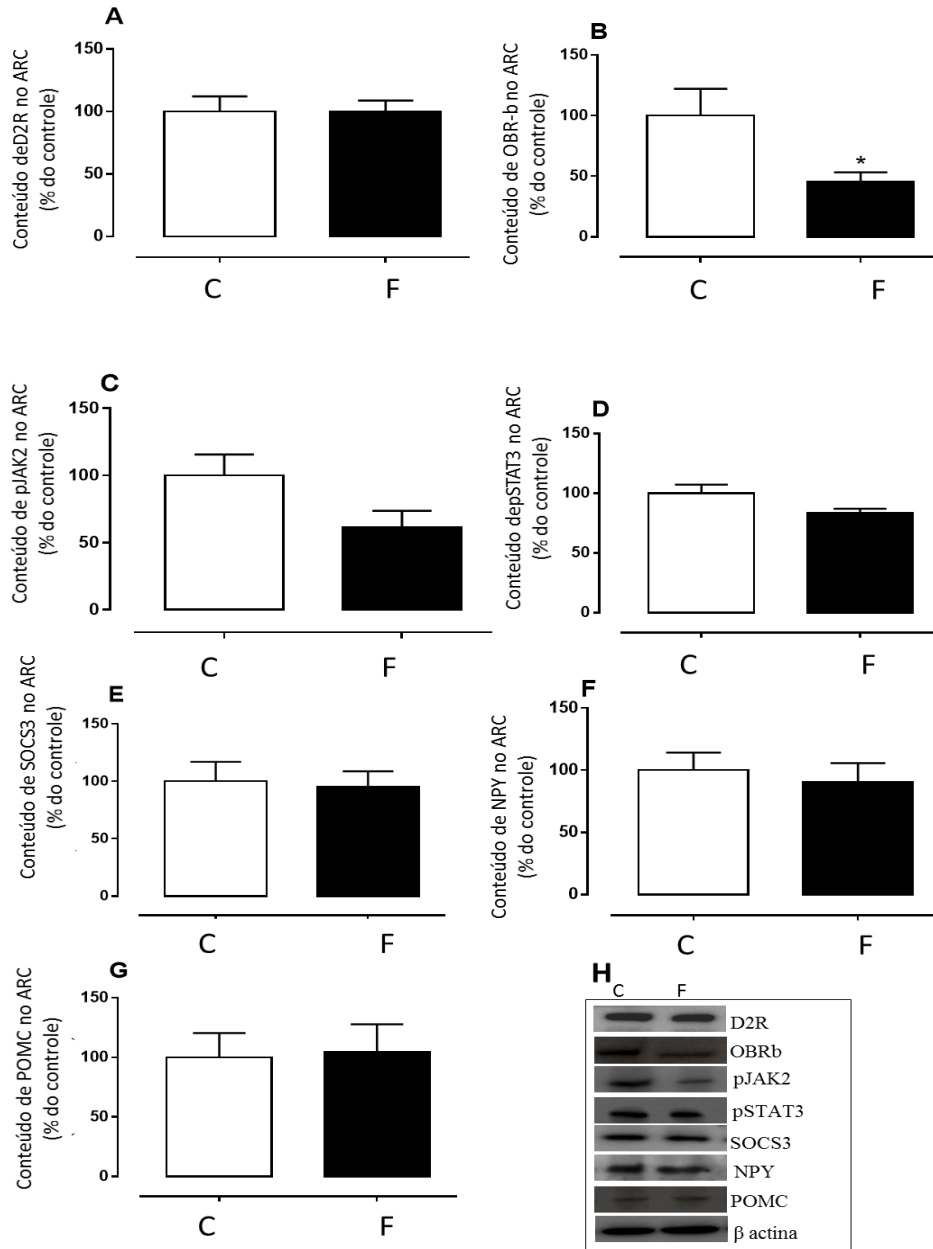
Figura 22: Efeitos da exposição neonatal ao fumo do tabaco no conteúdo das proteínas TH, DDC, D1R, D2R e DAT no estriado dorsal (DS).



Legenda: Conteúdo de TH (A), DDC (B), D1R (C), D2R (D) e DAT (E) no DS das proles em PN180. As bandas representam o conteúdo das proteínas no DS individualmente dos animais C e F (F). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; F: grupo fumaça.

No ARC, o grupo F apresentou menor conteúdo de OBR-b, quando comparado com o grupo C (-54,5%, $t = 2,33$, $p < 0,05$, fig 23B), mas nenhuma alteração no conteúdo de D2R, pJAK2, PSTAT3, SOCS3, NPY e POMC (figs 23A, 23C, 23D, 23E, 23F e 23G, respectivamente).

Figura 23: Efeitos da exposição neonatal ao fumo do tabaco no conteúdo das proteínas D2R, OBR-b, pJAK2, pSTAT3, SOCS3, NPY e POMC no núcleo arqueado (ARC).



Legenda: Conteúdo de D2R (A), OBR-b (B), pJAK2 (C), pSTAT3 (D) SOCS3 (E), NPY (F) e POMC (G) no ARC das proles em PN180. As bandas representam o conteúdo das proteínas no ARC individualmente dos animais C e F (H). Conteúdo de actina foi utilizado como controle. Valores expressos como média \pm SEM (n = 7 por grupo). C: grupo controle; F: grupo fumaça.

4 DISCUSSÃO

O tabagismo materno nos períodos críticos de gestação ou lactação está relacionado a diferentes danos para a prole. Em gestantes, a exposição ao fumo pode ser prejudicial ao feto. Um único cigarro fumado pela mãe já é capaz de acelerar os batimentos cardíacos do feto (Muller et al, 2002). Durante a lactação, a nicotina, o principal componente químico do cigarro, é transferida através do leite materno podendo causar taquicardia na prole devido ao aumento da ação adrenérgica (Mello et al, 2001). Esse efeito provavelmente ocorre por ação da nicotina aumentando a secreção de catecolaminas na medula adrenal. Além disso, estudos epidemiológicos têm demonstrado associação entre crianças cujos pais fumam e maior vulnerabilidade ao vício na adolescência, incluindo ao fumo do tabaco (Vargas et al., 1999) e comida palatável. O presente estudo demonstrou que tanto a exposição isolada à nicotina como a exposição à fumaça do cigarro durante o período da lactação resultaram em importantes alterações no sistema dopaminérgico das proles, programando o comportamento alimentar devido a diminuição dopaminérgica no NAc.

4.1 Efeitos da exposição a nicotina no sistema dopaminérgico e ARC das ratas lactantes no fim da lactação (21 dias)

Observamos menor conteúdo de TH nas lactantes NIC, que é a principal enzima responsável pela síntese da catecolamina nos neurónios dopaminérgicos no VTA. Em relação ao NAc, lactantes NIC apresentaram menor conteúdo de TH e maior conteúdo de DAT, D1R e D2R. DAT é um transportador responsável pela recaptação de dopamina e a sua remoção na fenda sináptica. Como a nicotina ativa o sistema de recompensa cerebral, levando a maior secreção de dopamina no VTA, NAc e DS (Brody et al., 2009), nossos dados sugerem um efeito de abstinência da retirada da droga uma vez que existe relação entre a retirada de uma droga e diminuição da dopamina no sistema de recompensa cerebral (Epping-Jordan et al, 1998; Natividad et al., 2010). A possível diminuição no conteúdo de dopamina no VTA e NAc pode estar relacionada com menor síntese e maior recaptação, pelo menos no NAc. Sabe-se que os receptores dopaminérgicos apresentam “down-regulation” quando os níveis de dopamina são mais elevados e “up-regulation” quando os níveis de dopamina são baixos (Zemlan et al., 1985). Nossos dados em conjunto sugere uma menor disponibilidade de dopamina na fenda sináptica, que contribue para a “up-regulation” de D1R e D2R no NAc.

Em relação a via de sinalização da leptina nos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos no VTA, observamos maior conteúdo de OBR-b e SOCS3 nas lactantes NIC no final da lactação, as quais apresentam hiperleptinemia como demonstrado por Oliveira et al. (2010). Assim, nossos dados sugerem maior ação da leptina nos neurônios dopaminérgicos no VTA. Sabe-se que a leptina reduz os níveis de dopamina e, por conseguinte, afeta os sinais de recompensa em roedores (Hommel et al., 2006). O aumento de sinais de recompensa por exemplo, com a utilização de drogas tais como a nicotina, aumenta a vulnerabilidade ao abuso de drogas. Quando a droga é rapidamente retirada, a falta de recompensa leva a síndrome de abstinência em humanos. Estudos experimentais demonstram que animais com resistência à leptina não apresentam diminuição na recompensa (Figlewicz et al., 2007) tornando-se bons candidatos para o vício. No presente estudo, a leptina parece agir normalmente, diminuindo a dopamina e o sistema de recompensa, agravando os sintomas de abstinência. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

O DS é importante para muitos processos neurocomportamentais, como aprendizagem, memória e controle motor (Graybiel, 1998; Lalonde e Botez-Marquard, 1997; Saint-Cyr et al, 1995; Yin HH and Knowlton, 2006). Esta região também é importante para o estímulo não-hedônico à alimentação por estar envolvida com respostas motoras necessárias para a obtenção de alimentos e o seu consumo. (Volkow et al., 2002). Todos esses processos em parte dependem da sinalização dopaminérgica em várias regiões cerebrais (Hornykiewicz, 2002; Palmiter, 2008; Volkow et al, 2002). Aqui, no DS das lactantes NIC, observamos apenas maior conteúdo de TH. É possível que a dopamina esteja aumentada e que a maior atividade dopaminérgica no DS possa estimular a ingestão de alimentos não hedônico nestes animais. No entanto, lactantes NIC no fim da lactação apresentam hipofagia (Oliveira et al., 2010) condição que não pode ser explicada por maior produção de dopamina no DS. Por outro lado, não avaliamos a atividade motora desses animais que nos ajudaria a entender a relevância deste achado.

Enquanto a sinalização da dopamina no DS e NAc é essencial para estimular a alimentação, no hipotálamo ela inibe a ingestão alimentar (Hanlon et al, 2004; Hoebel et al, 1989). Anteriormente, demonstramos hiperleptinemia e hipofagia nas lactantes NIC (Oliveira et al., 2010). A hipofagia nessas lactantes não parece ocorrer devido à ativação da via clássica JAK2-STAT3, uma vez que, neste estudo, só observamos maior conteúdo de SOCS3. Por outro lado, como a leptina pode reduzir a ingestão alimentar através de um mecanismo dependente de D2R (Billes et al., 2012), o maior conteúdo de D2R no ARC pode explicar a hipofagia nas lactantes NIC.

4.2 Efeitos da exposição à nicotina sobre o sistema dopaminérgico e ARC da prole lactente

Embora não observamos alteração no conteúdo de TH nas proles em PN15, os animais NIC apresentaram aumento no conteúdo de D1R e D2R e diminuição de DAT no NAc. Estas mudanças contribuem para o aumento da atividade dopaminérgica na região, aumentando a sensação de prazer e recompensa, podendo aumentar a vulnerabilidade à dependência e sintomas de abstinência. Tanto o DS e ARC não apresentaram qualquer alteração nas proteínas analisadas. Estes achados provavelmente ocorreram devido à baixa quantidade de nicotina que as proles receberam através do leite materno, uma vez que os filhotes NIC apresentaram níveis muito baixos de cotinina no soro em comparação com as mães lactantes (Oliveira et al., 2010). Assim, parece que o NAc é mais sensível aos efeitos da nicotina. Todas as alterações observadas na prole NIC no NAc no final da exposição à nicotina (PN15) foram revertidas ao desmame (na ausência de nicotina). Normalmente, espera-se um efeito rebote após a retirada de uma droga. Provavelmente, estes resultados devem-se em parte a menor sensibilidade a retirada da nicotina em ratos jovens (O'Dell et al., 2004, 2007). Ao desmame, as proles NIC apresentaram menor conteúdo de DAT no DS, o que pode indicar uma maior ação dopaminérgica nesta região. A maior atividade dopaminérgica no DS pode aumentar a vulnerabilidade a efeitos duradouros sobre o comportamento, tais como os sintomas negativos a esquizofrenia em humanos (Martínez-Téllez et al., 2009). Apesar das proles em PN21 apresentar menor conteúdo de pSTAT3 no ARC, é pouco provável que a resistência à leptina esteja ocorrendo, desde que o conteúdo de POMC e NPY não foram alterados.

4.3 Efeito da exposição à nicotina sobre o comportamento das proles lactentes

Apesar de vários estudos em animais demonstrarem que o uso da nicotina ou a sua retirada induz resultados negativos que são idênticos aos observados em humanos (DiFranza et al, 2004b; Eppolito et al, 2010; Smith et al, 2006; Sobrian et al ., 2003;. Vaglenova et al, 2004), o mecanismo de ação da nicotina não está bem estabelecido. Diferentes estudos demonstraram que a exposição a nicotina pode induzir um efeito ansiolítico (Brioni et al, 1993; Cohen et ai, 2009; Kupferschmidt et al, 2010). Em roedores, estudos têm demonstrado diminuição do comportamento semelhante a ansiedade durante a exposição à nicotina (Adriani et al, 2004; Elliott et al, 2004) e um efeito ansiogênico durante a sua retirada (Abreu-Villaça et al, 2008; Smith et al., 2006). Os efeitos da nicotina dependem de diversas variáveis,

como dose, período de exposição à nicotina, sexo, duração do período de retirada e os testes utilizados na avaliação comportamental (Brioni et al, 1993; Cohen et al, 2009; Costall et al., 1989; arquivo et al, 2000; Irvine et al, 2001; Zarrindast et al, 2012). Sintomas de retirada da nicotina, incluem depressão, ansiedade e irritabilidade (Hughes and Hatsukami, 1986; Hughes et al., 1991) em indivíduos dependentes e podem contribuir para a dependência ao vício da nicotina (Markou et al., 1998; Shiffman et al., 1996).

Diversos estudos mostram a relação entre a exposição à nicotina e diminuição da ansiedade. Entretanto, quando avaliamos o comportamento semelhante a ansiedade nas proles NIC em PN14, não observamos nenhum efeito sobre a % de Entradas no CN no teste do campo aberto. Porém, durante a retirada (PN20), observamos menor número de entradas no braço aberto no teste do labirinto em cruz elevado, nas proles NIC, o que sugere aumento do comportamento semelhante a ansiedade.

Em relação ao comportamento de hiperatividade, vários estudos com humanos e modelos animais têm relatado que a nicotina induz hiperatividade (DiFranza et al, 2004a; O'Neill et al, 1991; Vaglenova et al, 2004). Porém, não observamos alteração na atividade locomotora durante a exposição (PN14) e após a retirada (PN20) da nicotina, quando os animais foram submetidos ao LCE ou CA.

Foi Observado que as proles NIC apresentaram redução da atividade exploratória, tal como medida pelo número de “mergulho de cabeça” no teste do LCE, em PN20. Abreu Villaça et al (2014) também observaram redução da atividade exploratória no final da exposição (PN45) e logo após o final da exposição (PN50) em ratos expostos a uma dose baixa de nicotina. A redução da atividade exploratória pode ser associada com sintomas de abstinência da nicotina (Hughes et al., 1991).

Em conjunto nossos dados demonstraram que a exposição pós-natal à nicotina induz alterações importantes no sistema mesocorticolímbico dopaminérgico tanto nas mães lactantes quanto nas proles, bem como nas características comportamentais da prole apenas durante a retirada da nicotina. As Alterações precoces no sistema de recompensa das proles NIC podem aumentar a vulnerabilidade para o uso de substâncias que causam dependência ou dietas palatáveis na vida adulta.

4.4 Efeitos da exposição precoce à nicotina na prole adulta

Aqui, nós mostramos que a prole exposta à nicotina (N-SSD) exibem uma mudança na preferência alimentar, o que foi caracterizado por um aumento da preferência pela dieta rica em açúcar, quando comparado com a prole C-SSD, e também têm alterações de comportamento indicativo de aumento da tomada de decisão no LCE e aumento da ansiedade no CA. Além disso, em PN170, o grupo N apresentou menor conteúdo de D2R e DAT no NAc e menor conteúdo de D2R no ARC, sugestivo de menor atividade dopaminérgica nessas regiões, enquanto o conteúdo de D2R no DS foi maior, sugestivo de maior atividade dopaminérgica. Estas alterações na via dopaminérgica corroboram as mudanças de comportamento e preferência alimentar descritas na literatura (Farde et al, 1997; Hanlon et al 2004; Avena et al., 2008).

4.5 Efeitos da exposição precoce à nicotina sobre a preferência alimentar da prole adulta

Apesar de alguns estudos demonstrarem que ratos têm uma maior atenção a um objeto desconhecido, incluindo alimentos, e podem decidir não ingerir um novo alimento (Cheney e Miller, 1997; Barnett, 2009), verificamos que as proles adultas (C-SSD e N-SSD) que puderam escolher entre as novas dietas palatáveis tiveram o consumo alimentar mais elevado quando comparado com os animais que apenas tiveram acesso a ração padrão já conhecida (C-SC e N-SC), um resultado que é explicado pelo aumento da palatabilidade de ambas dietas, rica em açúcar e rica em gordura. Assim, os grupos SSD demonstraram baixa resistência ao novo alimento. Modlinska et al. (2015) também mostrou que ratos não evitam ingerir alimentos desconhecidos, mas têm apenas uma redução temporária da ingestão do novo alimento consumido. De fato, ambos os grupos SSD ingeriram maior quantidade de dieta palatável na segunda exposição (PN160), provavelmente devido ao primeiro contato com esses alimentos em PN150. A Exposição precoce à nicotina não afetou o consumo total de alimentos, tanto nos animais SC ou SSD. A ingestão de calorias também não foi diferente entre os grupos. Além disso, ambos grupos preferiram a dieta rica em gordura quando comparada com a dieta com elevado teor de açúcar. Esta conclusão difere do estudo de Palou et al (2010), que demonstraram que animais controles ingeriram mais a dieta rica em sacarose do que a dieta rica em gordura. É importante ressaltar, que o estudo de Palou é diferente em alguns aspectos: eles usaram sacarose e dietas líquidas de lipídios insaturados, enquanto, em nosso estudo, foi utilizada sacarose e lipídios saturados (manteiga) na forma peletizada.

Embora ambos os grupos SSD no presente estudo terem escolhido a dieta rica em gordura, os ratos N-SSD ingeriram consideravelmente mais dieta rica em açúcar, quando comparados aos ratos C-SSD. Nosso estudo confirma o de Lacy et al (2012), que demonstraram que a exposição pré-natal à nicotina resultou no aumento da motivação para a recompensa de sacarose nos ratos adultos. Além disso, também tem sido demonstrado que ratos adultos cronicamente expostos à nicotina ingerem maior quantidade de sacarose do que o grupo controle (JIAS & Ellison 1990). Apesar da maior ingestão da dieta rica em açúcar, o grupo N-SSD ingeriu ligeiramente menor quantidade da dieta rica em gordura do que o grupo C-SSD, que provavelmente explica por que esses grupos não apresentaram diferença na ingestão total de calorias.

4.6 Efeitos da exposição precoce à nicotina sobre o comportamento

Vários estudos têm demonstrado os efeitos da nicotina sobre os níveis de ansiedade em roedores adolescentes e adultos (Aydin et al 2012a, 2012b; Abreu-Villaça et al 2008;. 2013; 2014; Falco et al 2014; & Santiago Huffman 2014). Quando avaliamos o comportamento semelhante a ansiedade induzida pela exposição precoce à nicotina, não encontramos nenhuma diferença quando os animais foram submetidos ao LCE na idade adulta. No entanto, estes animais apresentaram maiores níveis do comportamento semelhante a ansiedade quando testados no teste CA, tal como indicado por uma atividade significativamente reduzida no centro da arena, o qual é usado como um índice de comportamento semelhante a ansiedade. Este resultado pode ser explicado, em parte, por alterações no sistema dopaminérgico, caracterizadas por menor conteúdo de D2R e DAT. Assim, esta alteração na via de recompensa cerebral pode aumentar a sensibilidade a drogas de abuso e à comida palatável. Nossos resultados corroboram estudos publicados sobre ansiedade e diminuição no conteúdo de D2R e DAT (Farde et al, 1997; Breier et al, 1998; Laakso et al., 2000).

No que diz respeito ao comportamento de tomada de decisão, os animais N exibiram aumento deste comportamento, como indicado pelos longos períodos que passaram no centro da arena do LCE. Esta alteração, possivelmente, justifica-se pela diminuição do conteúdo de D2R, uma vez que tem sido demonstrada correlação inversa entre estes parâmetros (Falco et al. 2014). Vários estudos têm demonstrado que o aumento da tomada de decisão está associada a predisposição para comportamentos gratificantes e viciantes (Wills et al, 1994;. Laviola et al, 1999; Zuckerman & Kuhlman 2000; Franques et al 2003; Palma et al 2014).

Nossos dados estão de acordo com as observações acima mencionadas, uma vez que demonstramos que os animais N apresentam modificações no sistema de recompensa, mais especificamente no conteúdo de D2R e DAT no NAc. Interessantemente, estas alterações são compatíveis com o aumento da ingestão de dieta hiperglicídica.

Apesar de vários estudos demonstrarem que a exposição precoce à nicotina provoca hiperatividade (Linnet et al 2003; Thapar et al 2003; Romero & Chen 2004; LeSage et al 2006; Botão et al 2007), há relevante discordância entre eles. Aqui, não encontramos diferenças na atividade locomotora na prole adulta exposta precocemente à nicotina. Estes dados estão de acordo com Lacy e colaboradores (2012), que constaram que a exposição pré-natal à nicotina não afeta a atividade locomotora quando os animais foram submetidos ao comportamento CA na idade adulta. Embora não observamos nenhuma diferença significativa na atividade locomotora, as proles N apresentaram alterações no conteúdo de D2R, no NAc, DS e ARC, quando comparados com o grupo C. Estes dados estão de acordo com estudos que demonstram que alterações no D2R afeta a ansiedade, apesar da locomoção não ser afetada (Rodgers et al, 1994; Zarrindast et al 2011). A falta de efeito sobre a atividade locomotora parece estar de acordo com o conteúdo do receptor μ -opióide na prole N adulta. Sabe-se que a ativação do receptor μ -opióide no DS regula indiretamente a atividade locomotora (Jabourian et al., 2005).

4.7 Efeitos da exposição precoce à nicotina sobre o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico na prole adulta

Os hormônios leptina e insulina apresentam receptores nos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos no VTA que quando ativados, estimulam sinais de recompensa, que têm o efeito de diminuir a ingestão de sacarose ou a utilização de outras drogas. Por outro lado, os animais com resistência à leptina ou à insulina não apresentam tal resposta (Figlewicz et al., 2007). Apesar da prole N adulta apresentar hiperleptinemia (Oliveira et al. 2009) e resistência hipotalâmica à leptina (Santos-Silva et al. 2010), não houve mudança no conteúdo do OBRb e SOCS3 no VTA que poderia explicar as mudanças na preferência alimentar neste grupo. Além disso, o grupo nicotina apresenta hiperinsulinemia (Oliveira et al. 2010b), que pode indicar resistência à insulina no VTA e, em parte, explicar o elevado consumo de sacarose pelo grupo nicotina. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta possibilidade.

Foram encontradas alterações na via dopaminérgica no NAc, como diminuição do conteúdo de D2R e DAT na prole nicotina adulta. A nicotina é uma droga que ativa o sistema de recompensa do cérebro, levando ao maior conteúdo de dopamina no DS e no NAc (Brody et al. 2009). O menor conteúdo de D2R no NAc está intimamente relacionado com maior predisposição ao uso de drogas, o aumento da compulsão alimentar e aumento do consumo de dietas palatáveis ou açucaradas (Avena et al., 2008). Corroborando Avena et al (2008), aqui observamos que a prole nicotina apresentaram maior consumo de sacarose em relação ao grupo controle. Como demonstrado anteriormente, a prole adulta nicotina apresenta obesidade central (Oliveira et al. 2009), que é parcialmente associada com a supressão da via dopaminérgica. De fato, tem sido proposto que a deficiência no processamento de recompensa pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de obesidade e que os indivíduos obesos comem compulsivamente alimentos saborosos para compensar a hipossensibilidade do sistema de recompensa (Wang et al., 2001).

Sendo o DAT responsável pela recaptação de dopamina e a sua remoção da fenda sináptica, a sua redução nos animais nicotina pode ter ocorrido como uma resposta adaptativa à diminuição de D2R. Assim, a diminuição DAT poderia melhorar a ação da dopamina. A possível maior concentração de dopamina na fenda sináptica não parece ter sido suficiente para normalizar o efeito. Sabe-se que o aumento na sinalização opióide no NAc está intimamente relacionado com a ingestão de gordura (Taha 2010). Aqui observamos uma pequena diminuição da ingestão de gordura no grupo N-SSD, sem alterações do receptor μ -opióide na prole nicotina adulta. Assim, a pequena redução na ingestão de gordura pode ser apenas uma resposta compensatória devido a um aumento na ingestão de sacarose, pois não houve alteração no receptor μ -opióide.

Embora no presente estudo não observamos mudanças no conteúdo de proteínas responsáveis pela síntese de dopamina (TH e DDC) no DS da prole nicotina, o conteúdo de D2R foi maior, o que sugere uma maior atividade dopaminérgica na região. No entanto, o consumo total alimentar, que pode ser caracterizado como alimentação "não-hedônico", não foi alterado no grupo nicotina que recebeu a dieta padrão ou a dieta mais palatável. Como já mencionado, não observamos alterações na atividade locomotora o que em parte pode justificar a normalização da ingestão total do grupo nicotina.

Em relação ao ARC, o grupo nicotina apresentou menor conteúdo de D2R, que poderia resultar em maior consumo alimentar por este grupo. No entanto, a prole nicotina não apresentou mudanças na ingestão total de alimentos, mesmo quando foi oferecida uma dieta mais palatável. Billes e colaboradores (2012) mostraram que a leptina reduz a ingestão de

alimentos através de um mecanismo dependente de D2R e que o bloqueio de D2R reduz este efeito hipofágico da leptina em camundongos. O fato do conteúdo de D2R ser menor no ARC pode explicar, pelo menos em parte, a resistência à leptina (Oliveira et al. 2010b).

Constatamos que a programação pela nicotina maternal modificou a preferência alimentar da prole, que consumiu mais dieta hiperglicídica quando comparada com o grupo controle. Tais mudanças nos padrões alimentares podem ter ocorrido devido a mudanças no sistema dopaminérgico no grupo exposto à nicotina, tais como menor D2R e DAT no NAc, maior D2R no DS e menor D2R no ARC. Essas mudanças foram associadas com comportamento de tomada de decisão no LCE, bem como o aumento dos níveis de ansiedade no CA. As modificações observadas no sistema de recompensa dopaminérgico e comportamentais nas proles adultas de ratas que foram expostas à nicotina durante a lactação podem estar associadas a maior susceptibilidade para o consumo de drogas de abuso.

4.8 Efeitos da exposição precoce à fumaça do tabaco na prole adulta

No presente estudo, demonstramos que a prole S-SSD ingeriu uma quantidade mais elevada da dieta rica em gordura quando comparada com a prole C-SSD. Além disso, em PN180, a prole S apresentou menor conteúdo de TH no VTA, assim como menor conteúdo de TH, D2R, e maior conteúdo de D1R no NAc, que sugerem um menor efeito dopaminérgico no sistema mesocorticolímbico.

4.9 Efeitos da exposição precoce à fumaça do tabaco sobre a preferência alimentar da prole adulta

Tem sido demonstrado que o jejum pode aumentar a ingestão de alimentos saborosos e drogas (Avena et al., 2005). Corroborando este estudo, após 12 horas de jejum, demonstramos que a prole com acesso às dietas palatáveis (C-SSD e S-SSD) apresentaram maior ingestão alimentar após 30 min, do que os grupos que só tinham acesso à ração padrão (C-SC e S-SC) o que indica maior voracidade pelos grupos com acesso às dietas palatáveis. Observamos, também, o aumento da ingestão alimentar pelos grupos SSD após 12 h, quando comparados com os seus respectivos controles (SC). Além disso, ambos os grupos SSD ingeriram mais a dieta hiperlipídica em detrimento da ração hiperglicídica. Embora ambos os grupos SSD terem escolhido a dieta rica em gordura, os ratos S-SSD ingeriram maior quantidade da dieta rica em gordura, após 30 min, bem como maior ingestão total alimentar (dieta hiperlipídica +

hiperglicídica), após 30 min e 12 horas, quando comparados com o grupo C-SSD. Nosso estudo corrobora dados anteriores que demonstraram maior preferência por gordura em adolescentes cujas mães foram expostas à fumaça do cigarro durante o período pré-natal (Haghighi et al 2013; Lee et al 2015). Em um estudo de coorte, uma maior preferência por carboidratos em indivíduos adultos cujas mães fumaram durante a gravidez foi demonstrado (Ayres et al. 2011). No entanto, no estudo de Ayres et al (2011) a comparação foi entre alimentos ricos em hidratos de carbono ou proteína. Um estudo em ratos mostrou que animais adultos nascidos de mães expostas à nicotina durante a gravidez apresentam maior motivação por sacarose (Lacy 2012 et al.). Além disso, ratos adultos expostos de forma aguda a nicotina também exibiu uma preferência para sacarose (JIAS e Ellison, 1990). No entanto, esses estudos investigaram apenas preferência sacarose e os animais foram expostos unicamente à nicotina e não ao fumo do tabaco. Embora a nicotina seja o principal componente que gera dependência do tabaco, é possível que outros componentes do fumo do cigarro interajam com nicotina ou possua os seus próprios efeitos, fazendo com que os efeitos da exposição ao fumo do cigarro sejam diferentes daqueles efeitos gerados pela exposição apenas à nicotina. Apesar das diferenças entre os estudos, todas eles demonstram aumento pela preferência em alimentos palatáveis.

4.10 Efeitos da exposição precoce à fumaça do tabaco sobre o comportamento

Os efeitos a longo prazo da exposição precoce à fumaça de cigarro sobre o comportamento ainda não estão estabelecidos. No entanto, sabe-se que a exposição ao tabaco durante a gestação pode levar a um aumento da propensão para distúrbios psicológicos (Cornelius et al. 2001). Um estudo recente demonstrou que camundongos expostos à fumaça de cigarro precocemente apresentam menores níveis de ansiedade (Cornelius et al. 2013). Em contraste, no presente estudo, os ratos expostos ao fumo do cigarro durante a lactação não exibiram alterações de ansiedade a longo prazo. No estudo de Cornelius e colaboradores, o período de exposição incluiu a gestação e lactação; além disso, os animais foram testados em uma idade mais jovem do que a do presente estudo (PN90 vs PN180). Acreditamos que essas variáveis explicam os resultados distintos entre os estudos. A ansiedade é considerada um fator relevante para o uso e abuso de drogas (Reus et al. 2014) e também influencia fortemente a ingestão alimentar (Skibicka e Dickson, 2013). Por conseguinte, a ausência de alterações no comportamento semelhante à ansiedade, como no presente estudo, sugere que este não influenciou o comportamento alimentar no presente estudo. Em relação a atividade

locomotora, aqui, não encontramos diferença significativa entre os ratos expostos à fumaça de cigarro e o grupo controle na idade adulta. Apesar das diferenças metodológicas, este resultado é semelhante ao descrito por Gaworski e colaboradores (2004), que sugere que a atividade locomotora é um comportamento mais robusto e menos susceptível aos efeitos a longo prazo da exposição precoce ao fumo de cigarro.

4.11 Efeitos da exposição precoce à fumaça do tabaco sobre o sistema de recompensa cerebral

O menor conteúdo de TH no VTA da prole S sugere diminuição na síntese de dopamina. Embora a presença de receptores de leptina no VTA esteja relacionada com sinais de recompensa (Figlewicz et al., 2007), o grupo S não apresentaram alterações no conteúdo das proteínas da via de sinalização da leptina (OBRb, pJAK2, pSTA3 e SOCS3) no VTA.

No NAc, observamos diminuição do conteúdo de TH, D2R e maior conteúdo de D1R na prole S adulta. Uma vez que os axônios dos neurônios dopaminérgicos do VTA são projetados para o NAc, a diminuição do conteúdo de TH no NAc é consistente com o menor conteúdo de TH observado no VTA. Em conjunto, a diminuição de TH e D2R sugerem menor atividade dopaminérgica nesta região. Estas alterações estão associadas com o aumento da vulnerabilidade ao uso de drogas, o aumento do consumo de dietas palatáveis e vício alimentar (Avena et al., 2008). Corroborando a literatura, aqui observamos que o grupo S apresentou maior consumo de alimentos palatáveis e ingestão de dieta rica em gordura em comparação com o seu controle. Além disso, já foi demonstrado que a diminuição da atividade do sistema de recompensa cerebral pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de obesidade e que indivíduos obesos podem apresentar dependência alimentar para compensar o hipossensibilidade do sistema de recompensa (Wang et al., 2001). De fato, demonstramos que ratos programados pela exposição precoce à fumaça do cigarro são obesos (Santos-Silva et al. 2013) e, no presente estudo, demonstramos que a prole S tem maior ingestão de dieta palatável e aumento da voracidade por dieta rica em gordura. Estes resultados podem ser associados com a supressão da via dopaminérgica.

Vários estudos têm mostrado que D1R regula positivamente a utilização de substâncias psicoestimulantes enquanto o D2R regula negativamente a sua utilização (Moratalla et al 1992; Lee et al 2006; Bertran-Gonzalez et al 2008; Hikida et al 2010; Lobo et al 2010; Ferguson et al 2011; Kim et al 2011; Lobo e Nestler, 2011; Pascoli et al 2011; Grueter et al 2013). Por outro lado, sabe-se que a redução de D2R ou aumento de D1R está

associado com o abuso e dependência de drogas (Worsley et al., 2000). No presente estudo, observamos diminuição no conteúdo de D2R e aumento de D1R, o que pode ter contribuído para o transtorno alimentar observada no grupo S.

O DS é importante para os comportamentos, tais como: atividade motora, memória e aprendizagem (Saint-Cyr et al 1995; Lalonde e Botez-Marquard 1997; Graybiel 1998; Yin and Knowlton 2006), a toxicodependência (Nestler 2005; Kreitzer e Malenka 2008), e para a resposta não hedônica a ingestão de alimentos (Volkow et al., 2002). A sinalização dopaminérgica no DS e outras regiões centrais, em parte, contribui para estes processos. No presente estudo não observamos alteração nas proteínas responsáveis pela síntese de dopamina, DAT e os receptores dopaminérgicos nos animais programados pela fumaça do cigarro. Além disso, não houve mudanças no comportamento, como a atividade locomotora, a ansiedade, tomada de decisões e ingestão alimentar de ração padrão, provavelmente devido à sinalização dopaminérgica inalterada no DS.

No ARC, observou-se apenas menor conteúdo de OBRb, o que pode ser indicativo de maior resistência ao efeito anorexígeno de leptina. Isto poderia explicar, em parte, a maior ingestão de dieta palatável pelo grupo S no desafio alimentar. Anteriormente demonstramos hiperleptinemia, e resistência hipotalâmica à leptina, caracterizada por menor OBRb, JAK2 e STAT3 com maior SOCS3 no modelo de programação pela exposição materna à nicotina (Oliveira et al 2009; Santos-Silva et al 2010) e no modelo de programação pela exposição direta à fumaça de cigarro (com uma maior dose de nicotina do que no presente estudo) em que foi observado hiperleptinemia e hiperfagia (Santos-Silva et al. 2013). Uma vez que no presente estudo, só verificamos menor conteúdo de OBRb na via de sinalização da leptina no ARC, sem alterações significativas no conteúdo de NPY e POMC no grupo S, não podemos dizer com certeza que esses animais apresentam resistência à leptina. No entanto, é possível que outros neuropeptídeos estejam afetados, tais como CART e AgRP. Assim, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese. Apesar das evidências de que a sinalização dopaminérgica no hipotálamo inibe a alimentação (Hoebel et al, 1989; Hanlon et al 2004), a prole S não apresentou alteração no conteúdo de D2R no ARC.

Assim, constatamos que a programação pela exposição à fumaça de cigarro durante a lactação mudou o comportamento alimentar da prole, que consumiu mais da dieta rica em gordura. Essa mudança parece estar associada com alterações no sistema dopaminérgico de recompensa cerebral.

Questionamentos importantes sobre os modelos

No primeiro modelo, a exposição foi apenas à nicotina, principal componente que causa dependência do cigarro. Já o segundo, a exposição, além da nicotina, foi com todos os outros componentes do cigarro. Na exposição à nicotina, lactantes receberam implante subcutâneo de minibombas que liberaram continuamente nicotina, na dose de 6mg/kg, do 2° ao 16° da lactação, sendo que esta atingiu a prole apenas pelo leite. Enquanto no modelo de exposição ao tabaco, mães e proles foram expostas do 3° ao 21° da lactação à fumaça do cigarro (dose de NIC, 0.73 mg/cigarro), 4 vezes ao dia por 1 hora cada exposição, de forma não contínua, com longos períodos sem acesso à fumaça (20:00 h até 9:00h do dia seguinte), ou seja a exposição ao tabaco foi ambiental (direta) e via leite. Diante dessas informações, podemos concluir que os dois modelos não podem ser totalmente comparáveis uma vez que a forma de exposição e as doses de nicotina foram diferentes. Mesmo assim, vamos levantar algumas questões importantes sobre os modelos.

Em ambos modelos, tanto a ausência da nicotina (nos dias 17, 18, 19, 20 e 21) como a exposição intermitente à fumaça do cigarro e com longo período de abstinência diária (20:00-9:00), levaram a diminuição de TH no NAc das lactantes no 21° dia da lactação. Tal diminuição nos sugere menor síntese de dopamina no NAc e sinais de abstinência à nicotina (Epping-Jordan et al, 1998; Natividad et al, 2010). Em relação as proles, estas apresentaram importantes alterações no NAc à curto prazo, que resultou em diminuição do sistema dopaminérgico no NAc e alterações do padrão alimentar, em longo prazo. Já foi demonstrado que a diminuição do sistema de recompensa cerebral é um fator de risco para o desenvolvimento de obesidade e que indivíduos obesos podem apresentar dependência alimentar para compensar a hipossensibilidade do sistema de recompensa (Wang et al, 2001). De fato demonstramos que os dois modelos experimentais programam para a obesidade (Oliveira et al, 2009; Santos-Silva et al, 2013) e para alteração na escolha alimentar. No modelo de exposição exclusiva à nicotina, as proles programadas exibiram maior ingestão da dieta hiperglicídica e no modelo de exposição à fumaça do cigarro, observamos na prole adulta, maior ingestão da dieta hiperlipídica e maior ingestão total (somatório de ambas dietas). Apesar das diferenças metodológicas entre os estudos acima, nos dois modelos experimentais, as proles programadas apresentaram aumento na preferência por alimentos palatáveis, seja por açúcar ou por lipídios. Não temos com os dados obtidos explicar o mecanismo pelo qual os dois modelos diferem quanto ao tipo de preferência alimentar, já que as alterações dopaminérgicas são similares e não houve alteração no conteúdo dos μ receptores opióides, que são mais relacionados com a preferência por lipídeos.

Considerando que comida palatável ativa o sistema de recompensa cerebral assim como as drogas de abuso (Liang et al, 2006; Rada et al, 2005) e que a diminuição dopaminérgica no NAc observada nos dois modelos é intimamente relacionada ao abuso de drogas (Thanos et al, 2008), nos questionamos: 1. Será que as proles programadas, pela exposição materna exclusiva à nicotina e pela exposição direta à fumaça do cigarro, também são viciadas por drogas de abuso, ou pela própria nicotina? No presente trabalho não direcionamos nossas avaliações para tal possibilidade. Seria muito interessante avaliar a auto-administração por alguma droga, por exemplo a nicotina, em nossos modelos de programação; 2. Diante das alterações no sistema de recompensa cerebral à curto prazo observadas em ambos modelos, será que essas proles também apresentariam diferentes escolhas alimentares no início da vida, ao desmame? Assim, faz-se necessário novos estudos envolvendo desafio alimentar precoce nestes animais, a exemplo do que foi realizado na idade adulta.

CONCLUSÃO

Evidenciamos que tanto a exposição isolada à nicotina como a exposição à fumaça do cigarro durante o período da lactação resultaram em importantes alterações no sistema dopaminérgico das proles, programando o comportamento alimentar devido a diminuição dopaminérgica no NAc.

REFERÊNCIAS

- Abreu-Villaça Y, de Carvalho Graça AC, Ribeiro-Carvalho A, NaiffVde F, Manhães AC, Filgueiras CC. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol in adolescent mice elicits memory and learning deficits both during exposure and withdrawal. *Nicotine Tob Res.* 2013. 15(7):1211-21.
- Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Correa-Santos M, Cavina CC, Naiff VF, Krahe TE, Manhães AC, Ribeiro-Carvalho A. Tobacco smoke containing high or low levels of nicotine during adolescence: effects on novelty-seeking and anxiety-like behaviors in mice. *Psychopharmacology.* 2014.
- Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Guthierrez M, Medeiros AH, Mattos MA, Pereira M dos S, Manhães AC, Kubrusly RC. Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus. *Nicotine Tob Res.* 2010. 12:776-80.
- Abreu-Villaça Y, Nunes F, do E Queiroz-Gomes F, Manhães AC, Filgueiras CC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short-term, and long-term withdrawal. *Neuropsychopharmacology.* 2008. 33(3):599-10.
- Abreu-Villaça Y, Queiroz-Gomes Fdo E, Dal Monte AP, Filgueiras CC, Manhães AC (2006) Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res.* 2006. 167(1):175-82.
- Adriani W, Granstrem O, Macri S, Izykenova G, Dambinova S, Laviola G. Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology.* 2004. 29(5):869-78.
- Al Mamun A, Lawlor DA, Alati R, O'Callaghan MJ, Williams GM, Najman JM. Does maternal smoking during pregnancy have a direct effect on future offspring obesity? Evidence from a prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol.* 2006. 164: 317- 25.
- Alevizaki M, Saltiki K, Voidonikola P, Mantzou E, Papamichael C, Stamatelopoulos K. Free thyroxine is an independent predictor of subcutaneous fat in euthyroid individuals. *Eur J Endocrinol.* 2009 161: 459-65.
- Amin A, Dhillon WS, Murphy KG. The central effects of thyroid hormones on appetite. *J Thyroid Res.* 2011.
- Avena NM and Hoebel BG. Amphetamine-sensitized rats show sugar-induced hyperactivity (cross-sensitization) and sugar hyperphagia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003. 74(3):635-9.
- Avena NM, Long KA, Hoebel BG. Sugar-dependent rats show enhanced responding for sugar after abstinence: evidence of a sugar deprivation effect. *Physiol Behav.* 2005. 84: 359-62.

Avena NM, Rada P, Hoebel BG. Evidence for sugar addiction: Behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci Biobehav*. 2008. 32: 20–39.

Aydin C, Oztan O, Isgor C (2012a) Long-term effects of juvenile nicotine exposure on abstinence-related social anxiety-like behavior and amygdalar cannabinoid receptor 1 (CB1R) mRNA expression in the novelty-seeking phenotype. *Behav Brain Res*. 2012a. 228(1):236-39.

Aydin C, Oztan O, Isgor C. Nicotine-induced anxiety-like behavior in a rat model of the novelty-seeking phenotype is associated with long-lasting neuropeptidergic and neuroplastic adaptations in the amygdala: effects of the cannabinoid receptor 1 antagonist AM251. *Neuropharmacology*. 2012b 63(8):1335-445.

Ayres C, Silveira PP, Barbieri MA, Portella AK, Bettiol H, Agranonik M, Silva AA, Goldani MZ. Exposure to maternal smoking during fetal life affects food preferences in adulthood independent of the effects of intrauterine growth restriction. *J Dev Orig Health Dis*. 2011. 2:162-67.

Balfour DJ. A comparison of the effects of nicotine and (+)-amphetamine on rat behaviour in an unsignalled Sidman avoidance schedule. *J Pharm Pharmacol*. 1990.42:257-60.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol*. 2003 18: 733-36.

Bassareo V and Di Chiara G. Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci*. 1997. 17:851–61.

Belin D and Deroche-Gamonet V. Responses to novelty and vulnerability to cocaine addiction: contribution of a multi-symptomatic animal model. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012.1:2(11).

Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P 3rd. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol*. 2009. 29–60.

Benwell ME, Balfour DJ, Birrell CE. Desensitization of the nicotine-induced mesolimbic dopamine responses during constant infusion with nicotine. *Br J Pharmacol*. 1995. 114:454–60.

Benwell ME, Balfour DJ, Khadra LF. Studies on the influence of nicotine infusions on mesolimbic dopamine and locomotor responses to nicotine. *Clin Investig*. 1994. 72:233–39.
Bergmann KE, Bergmann RL, Kries VR, Böhm O, Richter R, Dudenhausen JW, Wahn U. Early determinants of childhood overweight and adiposity in a birth cohort study: role of breast-feeding. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003. 27: 162–72.

Berthoud HR. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity*. 2006. 14:197S–200S.

Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamales M, Herve D, Valjent E, Girault JA. Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci*. 2008. 28: 5671– 85.

Billes SK, Simonds SE, Cowley MA. Leptin reduces food intake via a dopamine D2 receptor-dependent mechanism. *Mol Metab.* 2012. 1:86–93.

Boutwell BB and Beaver KM. Maternal cigarette smoking during pregnancy and offspring externalizing behavioral problems: a propensity score matching analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2010. 7(1):146-63.

Breese GR, Duncan GE, Napier TC, Bondy SC, Iorio LC, Mueller RA. Hydroxydopamine treatments enhance behavioral responses to intracerebral microinjection of D1- and D2-dopamine agonists into nucleus accumbens and striatum without changing dopamine antagonist binding. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987. 240:167–76.

Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, Weinberger DR, Weisenfeld N, Malhotra AK, Eckelman WC, Pickar D. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: Evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998. 94: 2569–74.

Breier A, Kestler L, Adler C, Elman I, Wiesenfeld N, Malhotra A, Pickar D. Dopamine D2 receptor density and personal detachment in healthy subjects. *Am J Psychiatry.* 1998. 155:1440–42.

Breslau N and Peterson EL. Smoking cessation in young adults: age at initiation of cigarette smoking and other suspected influences. *Am J Public Health.* 1996. 86: 214–20.

Brioni JD, O'Neill AB, Kim DJB, Decker MW. Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated-plus maze test. *Eur J Pharmacol.* 1993. 238:1–8.

Brody AL, Mandelkern MA, Olmstead RE, Allen-Martinez Z, Scheibal D, Abrams AL, Costello MR, Farahi J, Saxena S, Monterosso J, London ED. Ventral striatal dopamine release in response to smoking a regular vs a denicotinized cigarette. *Neuropsychopharmacology.* 2009. 34:282–89.

Brunzell DH, Boschen KE, Hendrick ES, Beardsley PM, McIntosh JM. Alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in the nucleus accumbens shell regulate progressive ratio responding maintained by nicotine. *Neuropsychopharmacology.* 2010. 35(3):665-73.

Button TM, Maughan B, McGuffin P. The relationship of maternal smoking to psychological problems in the offspring. *Early Hum Dev.* 2007. 83(11):727-32.

Cavalcante T. Programa Nacional de Controle do Tabagismo. Avanços e Desafios. CONPREV. Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2001.

Chen J and Millar WJ. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Rep.* 1998. 9:39–46.

Cheney CD, Miller ER. Effects of forced flavor exposure on food neophobia. *Appl Anim Behav Sci.* 1997. 53: 213.

Churg DF and Prior WA. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect.* 1985. 64: 111-126.

Clarke PBS and Kumar R. Characterization of the locomotor stimulant action of nicotine in tolerant rats. *Br J Pharmacol.* 1983b. 80:587–94.

Clarke PBS and Kumar R. The effects of nicotine on locomotor activity in nontolerant and tolerant rats. *Br J Pharmacol.* 1983^a. 78:329–37.

Cohen A, Young RW, Velazquez MA, Groysman M, Noorbehesht K, Ben-Shahar OM, et al. Anxiolytic effects of nicotine in a rodent test of approach–avoidance conflict. *Psychopharmacology.* 2009. 204:541–9.

Cornelius MD, Ryan, CM, Day NL, Goldschmidt L, Willford JA. Prenatal tobacco effects on neuropsychological outcomes among preadolescents. *J Dev Behav Pediatr.* 2001. 22: 217-25.

Corrigall WA, Franklin KB, Coen KM, Clarke PB. The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine. *Psychopharmacology.* 1992. 107: 285–89.

Costall B, Kelly ME, Naylor RJ, Onaivi ES. The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989. 33:197–203.

Cronan T, Conrad J, Bryson R. Effects of chronically administered nicotine and saline on motor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1985. 22:897–99.

Dahlström A, Lundell B, Curvall M, Thapper L. Nicotine and cotinine concentrations in the nursing mother and her infant. *Acta Paediatr Scand.* 1990. 79(2):142-47.

Dallongeville J, Marécaux N, Fruchart JC, Amouyel P. Cigarette smoking is associated with unhealthy patterns of nutrient intake: a meta-analysis. *J Nutr.* 1998. 128:1450–57.

de Moura EG, Lisboa P, Passos MC. Neonatal programming of neuroimmunomodulation-role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation.* 2008. 15: 176–88.

de Pergola G, Ciampolillo A, Alo` D, Sciaraffia M, Guida P. Free triiodothyronine is associated with smoking habit, independently of obesity, body fat distribution, insulin, and metabolic parameters. *J Endocrinol Invest.* 2010. 815–18.

de Vries TJ, Cools AR, Shippenberg TS. Infusion of a D-1 receptor agonist into the nucleus accumbens enhances cocaine-induced behavioural sensitization. *Neuroreport.* 1998. 9:1763–68.

Di Chiara G and Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988. 85:5274–78.

DiFranza JR, Aligne CA, Weitzman M. Prenatal and postnatal environmental tobacco smoke exposure and children's health. *Pediatrics.* 2004a; 113:1007-15.

DiFranza JR, Savageau JA, Rigotti NA, Ockene JK, McNeill AD, Coleman M, Wood C. Trait anxiety and nicotine dependence in adolescents: a report from the DANDY study. *Addict Behav.* 2004b. 29(5):911-19.

Dreher JK and Jackson DM. Role of D1 and D2 dopamine receptors in mediating locomotor activity elicited from the nucleus accumbens of rats. *Brain Res.* 1989. 487:267–77.

Durieux PF, Bearzatto B, Guiducci S, Buch T, Waisman A, Zoli M, Schiffmann SN, de Kerchove d'Exaerde A. D2R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and reward processes. *Nat Neurosci.* 2009.12: 393–95.

Durieux PF, Schiffman SN, de Kerchoved'Exaerde A. Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum regions. *EMBO J.* 2012. 31:640–53.

Durmus B, Kruihof CJ, Gilmar MH, Willensen SP, Hofman A, Raat H, Eilers PHC, Steegers EAP, Jaddoe VWV. Parental smoking during pregnancy: early growth, and risk of obesity in preschool children: the Generation R Study. *Am J Clin Nutr.* 2011. 94: 164–71.

Dwyer JB, McQuown SC, Leslie FM. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol Ther.* 2009. 122: 125–39.

Einarson A and Riordan S. Smoking in pregnancy and lactation: a review of risks and cessation strategies. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009. 65(4): 325-30.

Elliott BM, Faraday MM, Phillips JM, Grunberg NE. Effects of nicotine on elevated plus maze and locomotor activity in male and female adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004. 77(1):21-8.

Epping-Jordan MP, Watkins SS, Koob GF, Markou A. Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal. *Nature.* 1998. 393(6680):76-9.

Eppolito AK, Bachus SE, McDonald CG, Meador-Woodruff JH, Smith RF. Late emerging effects of prenatal and early postnatal nicotine exposure on the cholinergic system and anxiety-like behavior. *Neurotoxicol Teratol.* 2010. 32(3):336-45.

Erlanson-Albertsson C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005. 97: 61–73

Eskenazi B, Prehn AW, Christianson RE. Passive and active maternal smoking as measured by serum cotinine: the effect on birth weight. *Am J Public Health.* 1995. 85(3): 395-98.

Falco AM, McDonald CG, Bachus SE, Smith RF. Developmental alterations in locomotor and anxiety-like behavior as a function of D1 and D2 mRNA expression. *Behav Brain Res.* 2014. 260:25-33.

Farde L, Gustavsson JP, Jonsson E. D2 dopamine receptors and personality traits. *Nature.* 1997. 385:590.

Fenercioglu AK, Tamer I, Karatekin G, Nuhoglu A. Impaired postnatal growth of infants prenatally exposed to cigarette smoking. *Tohoku J Exp Med.* 2009. 218: 221-28.

- Ferguson SM, Eskenazi D, Ishikawa M, Wanat MJ, Phillips PE, Dong Y, Roth BL, Neumaier JF. Transient neuronal inhibition reveals opposing roles of indirect and direct pathways in sensitization. *Nat Neurosci*. 2011. 14: 22–24.
- Figlewicz DP. Insulin, food intake, and reward. *Semin Clin Neuropsychiatry*. 2003. 8(2):82-93.
- Figlewicz DP, Evans S, Murphy J, Hoen M, Baskin D. Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Res*. 2003. 964: 107–15.
- Figlewicz DP, MacDonald Naleid A, Sipols AJ. Modulation of food reward by adiposity signals. *Physiol Behav*. 2007. 91(5):473-8.
- Figlewicz DP, Szot P, Chavez M, Woods SC, Veith RC. Intraventricular insulin increases dopamine transporter mRNA in rat VTA/substantia nigra. *Brain Res*. 1994. 644(2):331-34.
- File SE, Cheeta S, Kenny PJ. Neurobiological mechanisms by which nicotine mediates different types of anxiety. *Eur J Pharmacol* 2000; 393:231–6.
- Filgueiras CC, Ribeiro-Carvalho A, Nunes F, Abreu-Villaça Y, Manhães AC. Early ethanol exposure in mice increases laterality of rotational side preference in the free-swimming test. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009; 93(2):148-54.
- Fowler CD, Arends MA, Kenny PJ. Subtypes of nicotinic acetylcholine receptors in nicotine reward, dependence, and withdrawal: evidence from genetically modified mice. *Behav Pharmacol*. 2008. 19: 461–84.
- Fraga MC, de Moura EG, da Silva Lima N, Lisboa PC, de Oliveira E, Silva JO, Claudio-Neto S, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y, Manhães AC. Anxiety-like, novelty-seeking and memory/learning behavioral traits in male Wistar rats submitted to early weaning. *Physiol Behav*. 2014. 124:100-6.
- Fraga MC, Moura EG, Silva JO, Bonomo IT, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. Maternal prolactin inhibition at the end of lactation affects learning/memory and anxiety-like behaviors but not novelty-seeking in adult rat progeny. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011. 100(1):165-73.
- Fraga-Marques MC, Moura EG, Claudio-Neto S, Trevenzoli IH, Toste FP, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. Neonatal hyperleptinaemiaprogrammes anxiety-like and novelty seeking behaviours but not memory/learning in adult rats. *Horm Behav*. 2009. 55(2):272-9.
- Fraga-Marques MC, Moura EG, Silva JO, Claudio-Neto S, Pereira-Toste F, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. Effects of maternal hyperleptinaemia during lactation on short-term memory/learning, anxiety-like and novelty-seeking behavioral traits of adult male rats. *Behav Brain Res*. 2010. 206(1):147-50.
- Franke RM, Park M, Belluzzi JD, Leslie FM. Prenatal nicotine exposure changes natural and drug-induced reinforcement in adolescent male rats. *Eur J Neurosci*. 2008. 27: 2952–61.

- Franques P, Auriacombe M, Piquemal E, Verger M, Brisseau-Gimenez S, Grabot D, Tignol J. Sensation seeking as a common factor in opioid dependent subjects and high risk sport practicing subjects. A cross sectional study. *Drug Alcohol Depend.* 2003. 69(2):121-26.
- Fulton S. Appetite and reward. *Front Neuroendocrinol.* 2010. 31: 85–103.
- Gao YJ, Holloway AC, Zeng ZH, Lim GE, Petrik JJ, Foster WG, Lee RM. Prenatal exposure to nicotine causes postnatal obesity and altered perivascular adipose tissue function. *Obes Res.* 2005. 13: 687-92.
- Garcia BG, Wei Y, Moron JA, Lin RZ, Javitch JA, Galli A. Akt is essential for insulin modulation of amphetamine-induced human dopamine transporter cell-surface redistribution. *Mol Pharmacol.* 2005 68(1):102-09.
- Garcia-Rill E, Buchanan R, McKeon K, Skinner RD, Wallace T. Smoking during pregnancy: postnatal effects on arousal and attentional brain systems. *Neurotoxicology.* 2007. 28(5):915-23.
- Gaworski CL, Carmines EL, Faqi AS, Rajendran N. In utero and lactation exposure of rats to 1R4F reference cigarette mainstream smoke: effect on prenatal and postnatal development. *Toxicol Sci.* 2004. 79: 157-69.
- Gessa GL, Muntoni F, Collu M, Vargiu L, Mereu G. Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res.* 1985. 348(1):201-03.
- Giglia R, Binns CW, Alfonso H. Maternal cigarette smoking and breastfeeding duration. *Acta Paediatr.* 2006. 95:1370-74.
- Gilbertson RJ, Barron S. Neonatal ethanol and nicotine exposure causes locomotor activity changes in preweanling animals. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005. 81(1):54-64.
- Gluckman PD, and Hanson MA. Developmental plasticity and human disease: research directions. *J Intern Med.* 2007. 261: 461-71.
- Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T. A conceptual frame work for the developmental Origins of health and disease. *J Dev Orig Health Dis.* 2010. 1: 6–18.
- Goldani MZ, Haeffner LSB, Agranonik M, Barbieri MA, Bettiol H, Silva AAM. Do early life factors influence body mass index in adolescents? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2007. 401: 1231–36.
- Gong W, Neill DB, Lynn M, Justice JR, Dopamine JB. D1/D2 agonists injected into nucleus accumbens and ventral pallidum differentially affect locomotor activity depending on site. *Neuroscience.* 1999. 93:1349–58.
- Graybiel AM. The Basal Ganglia and Chunking of Action Repertoires. *Neurobiol Learn Mem.* 1998. 70:119–36.
- Grueter BA, Robison AJ, Neve RL, Nestler EJ, Malenka RC. Δ FosB differentially modulates nucleus accumbens direct and indirect pathway function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013. 110:1923–28.

Grüin F and Blumberg B. Endocrine disrupters as obesiogens. *Mol Cell Endocrinol*. 2009.304(1-2):19-29.

Haghighi A, Schwartz DH, Abrahamowicz M, Leonard GT, Perron M, Richer L, Veillette S, Gaudet D, Paus T, Pausova Z. Prenatal exposure to maternal cigarette smoking, amygdala volume, and fat intake in adolescence. *JAMA Psychiatry*. 2013. 70:98-105.

Hajnal A, Smith GP, Norgren R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004. 286:R31–R37.

Hakan RL and Ksir C. Acute tolerance to the locomotor stimulant effects on nicotine in the rat. *Psychopharmacology*. 1991. 104:386–90.

Hanlon EC, Baldo BA, Sadeghian K, Kelley AE. Increases in food intake or food-seeking behavior induced by GABAergic, opioid, or dopaminergic stimulation of the nucleus accumbens: is it hunger? *Psychopharmacology*. 2004. 172:241–7.

Hannöver W, Thyrian JR, Ebner A, Röske K, Grempler J, Kühl R et al. Smoking during pregnancy and postpartum: smoking rates and intention to quit smoking or resume after pregnancy. *J Womens Health (Larchmt)*. 2008.17(4):631-640.

Heath CJ, Horst NK, Picciotto MR. Oral nicotine consumption does not affect maternal care or early development in mice but results in modest hyperactivity in adolescence. *Physiol Behav*. 2010. 101(5):764-69.

Hegaard HK, Kjaergaard H, Møller LF, Wachmann H, Ottesen B. The effects of environmental tobacco smoke during pregnancy on birth weight. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2006. 85: 675–81.

Henningfield JE, Clayton R, Pollin W. Involvement of tobacco in alcoholism and illicit drug use. *Br J Addict*. 1990. 85:279– 91.

Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathway store ward and aversive behavior. *Neuron*. 2010. 66: 896–907.

Hilario MR, Turner JR, Blendy JA. Reward sensitization: effects of repeated nicotine exposure and withdrawal in mice. *Neuropsychopharmacology*. 2012. 37(12):2661-70.

Hildebrand BE, Nomikos GG, Bondjers C, Nisell M, Svensson TH. Behavioral manifestations of the nicotine abstinence syndrome in the rat: peripheral versus central mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997. 129(4):348-56.

Hoebel BG, Hernandez L, Schwartz DH, Mark GP, Hunter GA. Microdialysis studies of brain norepinephrine, serotonin, and dopamine release during ingestive behavior. Theoretical and clinical implications. *Ann N Y Acad Sci*. 1989. 575:171-91.

Holloway AC, Lim GE, Petrik JJ, Foster WJ, Morrison KM, Gerstein HC. Fetal and neonatal exposure to nicotine in Wistar rats results in increased b cell apoptosis at birth and postnatal endocrine and metabolic changes associated with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2005. 48 2661–66.

Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu ZW, Gao XB, Thurmon JJ, Marinelli M, DiLeone RJ. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron*. 2006. 51(6):801-10.

Hornykiewicz O. L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. *Amino Acids*. 2002. 23: 65–70.

Hubbell CL, Mankes RF, Reid LD. A small dose of morphine leads rats to drink more alcohol and achieve higher blood alcohol concentrations. *Alcohol Clin Exp Res*. 1993.17:1040–43.

Hughes J R, Gust SW, Skoog K, Keenan R M, Fenwick JW. Symptoms of tobacco withdrawal: a replication and extension. *Arch Gen Psychiatry*. 1991. 48: 52–9.

Hughes JR and Hatsukami D. Signs and symptoms of tobacco withdrawal. *Arch Gen Psychiatry*. 1986. 43:289–94.

Hughes JR. Effects of abstinence from tobacco: valid symptoms and time course. Review. *Nicotine Tob Res*. 2007. (3):315-27.

Hukkanen J, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev*. 2005. 57(1):79-115.

IBGE- Pesquisa de orçamento familiar 2008/2009 (POF 2008/2009).
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=25

Irvine EE, Bagnalasta M, Marcon C, Motta C, Tessari M, File SE, Chiamulera C. Nicotine self-administration and withdrawal: modulation of anxiety in the social interaction test in rats. *Psychopharmacology*. 2001. 153:315–20.

Jabourian M, Venance L, Bourgoïn S, Ozon S, Pérez S, Godeheu G, Glowinski J, Kemel ML. Functional mu opioid receptors are expressed in cholinergic interneurons of the rat dorsal striatum: territorial specificity and diurnal variation. *Eur J Neurosci*. 2005. 21(12):3301-09.

Jauniaux E, Gulbis B, Acharya G, Thiry P, Rodeck C. Maternal Tobacco Exposure and Cotinine Levels in Fetal Fluids in the First Half of Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*. 1999. 93:25-29.

Jias LM and Ellison G. Chronic nicotine induces a specific appetite for sucrose in rats. *Pharmacol biochem behave*. 1990. 35:489-491.

Johnson PM and Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci*. 2010. 13:635-41.

Kar BR, Rao SL, Chandramouli BA. Cognitive development in children with chronic protein energy malnutrition. *Behav Brain Funct*. 2008. 4:31.

Kim J, Park BH, Lee JH, Park SK, Kim JH. Cell type-specific alterations in the nucleus accumbens by repeated exposures to cocaine. *Biol Psychiatry*. 2011. 69: 1026–34.

- Koshy G, Delpisheh A, Bradin BJ. Dose response association of pregnancy cigarette smoke exposure, childhood stature, overweight and obesity. *Eur J Public Health*. 2010. 21: 286–91.
- Kreitzer AC and Malenka RC. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*. 2008. 60:543–54.
- Kupferschmidt DA, Funk D, Erb S, Lê AD. Age-related effects of acute nicotine on behavioural and neuronal measures of anxiety. *Behav Brain Res*. 2010. 213:288–92.
- Laakso A, Vilkmann H, Kajander J, Bergman J, Paranta M, Solin O, Hietala J. Prediction of detached personality in healthy subjects by low dopamine transporter binding. *Am J Psychiatry*. 2000. 157:290–92.
- Lacy RT, Hord LL, Morgan AJ, Harrod SB. Intravenous gestational nicotine exposure results in increased motivation for sucrose reward in adult rat offspring. *Drug Alcohol Depend*. 2012. 124: 299– 306.
- Lalonde R and Botez-Marquard T. The neurobiological basis of movement initiation. *Rev Neurosci*. 1997. 8 (1):35–54.
- Lambers DS, Clark KE. The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Semin perinatol*. 1996. 20:115-26.
- Laviola G, Adriani W, Terranova ML, Gerra G. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. *Neurosci Biobehav Rev*. 1999. 23(7):993-1010.
- Lee KW, Abrahamowicz M, Leonard GT, Richer L, Perron M, Veillette S, Reischl E, Bouchard L, Gaudet D, Paus T, Pausova Z. Prenatal exposure to cigarette smoke interacts with OPRM1 to modulate dietary preference for fat. *J Psychiatry Neurosci*. 2015. 40:38-45.
- Lee KW, Kim Y, Kim AM, Helmin K, Nairn AC, Green- gard P. Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 2006. 103: 3399–404.
- LeSage MG, Gustaf E, Dufek MB, Pentel PR. Effects of maternal intravenous nicotine administration on locomotor behaviour in pre-weanling rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006. 85: 575–83.
- Liang NC, Hajnal A, Norgren R. Sham feeding corn oil increases accumbens dopamine in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006. 291:R1236–R39.
- Lichtensteiger W, Ribary U, Schlumpf M, Odermatt B, Widmer HR. Prenatal adverse effects of nicotine on the developing brain. *Progress in Brain Research*. 1988. 73 137– 57.
- Liguori A, Hughes JR, Goldberg K, Callas P. Subjective effects of oral caffeine in formerly cocaine-dependent humans. *Drug Alcohol Depend*. 1997. 39:17– 24.
- Linnert KM, Dalsgaard S, Obel C, Wisborg K, Henriksen TB, Rodriguez A, Kotimaa A, Moilanen I, Thomsen PH, Olsen J, Jarvelin MR. Maternal lifestyle factors in pregnancy risk

of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. *Am J Psychiatry*. 2003. 160(6):1028-40.

Linnet KM, Wisborg K, Obel C, Secher NJ, Thomsen PH, Agerbo E, Henriksen TB. Smoking during pregnancy and the risk for hyperkinetic disorder in offspring. *Pediatrics*. 2005.116(2):462-7.

Lisboa PC, de Oliveira E, de Moura EG. Obesity and endocrine dysfunction programmed by maternal smoking in pregnancy and lactation. *Front Physiol*. 2012. 3: 437.

Lobo MK and Nestler EJ. The striatal balancing act in drug addiction: distinct roles of direct and indirect pathway medium spiny neurons. *Front Neuroanat*. 2011. 5:41.

Lobo MK, Covington HE 3rd, Chaudhury D, Friedman AK, Sun H, Damez-Werno D, Dietz DM, Zaman S, Koo JW, Kennedy PJ, Mouzon E, Mogri M, Neve RL, Deisseroth K, Han MH, Nestler EJ. Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science*. 2010. 330: 385–90.

Lucas A . The effects of childhood diet on adult health and disease. *J Nutr*.1998. 128: 401-06.

Luck W and Nau H. Nicotine and cotinine concentrations in serum and milk of nursing smokers. *Br J Clin Pharmacol*. 1984. 18(1): 9-15.

Malin DH, Lake JR, Newlin-Maultsby P, Roberts LK, Lanier JG, Carter VA, Cunningham JS, Wilson OB. Rodent model of nicotine abstinence syndrome. *Pharmacol Biochem Behav*. 1992. 43(3):779-84.

Manhães AC, Guthierrez MC, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y. Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *BehavBrain Res*. 2008. 193(2):216-24.

Mark GP, Blander DS, Hoebel BG. A conditioned stimulus decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens after the development of a learned taste aversion. *Brain Res*. 1991. 551:308–10.

Markou A, Kosten TR, Koob GF. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology*. 1998. 18: 135–74.

Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras*. 2009. 24: 69-74.

Martínez-Téllez RI, Hernández-Torres E, Gamboa C, Flores G. Prenatal stress alters spine density and dendritic length of nucleus accumbens and hippocampus neurons in rat offspring. *Synapse*. 2009. 63(9):794-804.

Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux JP, Evrard A, Cazala P, Cormier A, Marnett-Engvall M, Dufour N, Cloëz-Tayarani I, Bemelmans AP, Mallet J, Gardier AM, David V, Faure P, Granon S, Changeux JP. Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature*. 2005. 7;436(7047):103-07.

- McBride CM and Pirie PL. Postpartum smoking relapse. *Addict Behav.* 1990.15:165-68.
- Mello PRB, Pinto GR, Botelho C. The influence of smoking on fertility, pregnancy and lactation. *J Pediatr.* 2001. 77(4): 257-64.
- Metcalf NB and Monaghan P. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends Ecol Evol.* 2001. 16: 254–60.
- Meyer ME. Effects of intraaccumbens dopamine agonist SK&F38393 and antagonist SCH23390 on locomotor activities in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993. 45:843–7.
- Mifsud JC, Hernandez L, Hoebel BG. Nicotine infused into the nucleus accumbens increases synaptic dopamine as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 1989. 30;478(2):365-67.
- Modlinska K, Stryjek R, Pisula W. Food neophobia in wild and laboratory rats (multi-strain comparison). *Behav Processes.* 2015. 113:41-50.
- Moratalla R, Robertson HA, Graybiel AM. Dynamic regulation of NGFI-A (zif268, egr1) gene expression in the striatum. *J Neurosci.* 1992. 12: 2609–22.
- Muller JS, Antunes M, Behle I, Texeira L, Zielinsky. Efeitos agudos do fumo sobre a hemodinâmica da circulação feto-materno-placentária. *Arq Bras Cardiol.* 2002. 78:148-51.
- Murrin LC, Ferrer JR, Wanyun Z, Haley NJ. Nicotine administration to rats: methodological considerations. *Life sciences.* 1987. 40: 1699-708.
- Nagel G, Arnold FJ, Wilhelm M, Link B, Zoellner I, Koenig W. Environment tobacco smoke and cardiometabolic risk in young children: results from a survey in south-west Germany. *Eur Heart J.* 2009. 30:1885-93.
- Narayanan U, Birru S, Vaglenova J, Breese CR. Nicotinic receptor expression following nicotine exposure via maternal milk. *Neuroreport.* 2002. 13(7):961-63.
- Natividad LA, Tejeda HA, Torres OV, O'Dell LE. Nicotine withdrawal produces a decrease in extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens that is lower in adolescent versus adult male rats. *Synapse.* 2010. 64(2):136-45.
- Nel MR and Morgan M. *Anaesthesia.* 1996. 51(4):309-11.
- Nesil T, Kanit L, Collins AC, Pogun S. Individual differences in oral nicotine intake in rats. *Neuropharmacology.* 2011. 61(1-2):189-201.
- Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? Review. *Nat Neurosci.* 2005. 8:1445-49.
- Newbold RR. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones.* 2010. 9(3): 206-17.
- Nichols ML, Hubbell CL, Kalsher NJ, Reid LD. Morphine increases intake of beer among rats. *Alcohol.* 1991. 8:237– 40.

- Nisell M, Nomikos GG, Svensson TH. Infusion of nicotine in the ventral tegmental area or the nucleus accumbens of the rat differentially affects accumbal dopamine release. *Pharmacol Toxicol.* 1994. 75(6):348-52.
- Obel C, Olsen J, Henriksen TB, Rodriguez A, Järvelin MR, Moilanen I, Parner E, Linnet KM, Taanila A, Ebeling H, Heiervang E, Gissler M. Is maternal smoking during pregnancy a risk factor for Hyperkinetic disorder? Findings from a sibling design. *Int J Epidemiol.* 2011. 40(2):338-45.
- O'Dell LE, Bruijnzeel AW, Ghozland S, Markou A, Koob GF. Nicotine withdrawal in adolescent and adult rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2004. 1021:167-74.
- O'Dell LE, Torres OV, Natividad LA, Tejeda HA. Adolescent nicotine exposure produces less affective measures of withdrawal relative to adult nicotine exposure in male rats. *Neurotoxicol Teratol.* 2007. 29(1):17-22.
- Oliveira E, Moura E, Santos-Silva A, Pinheiro CR, Lima NS, Nogueira Neto JF, Nunes-Freitas AL, Abreu-Villaça Y, Passos MC, Lisboa PC. Neonatal nicotine exposure causes insulin and leptin resistance and inhibits hypothalamic leptin signaling in adult rat offspring. *J Endocrinol.* 2010b. 206: 55-63.
- Oliveira E, Moura E, Santos-Silva A, Fagundes AT, Rios AS, Abreu-Villaça Y, Nogueira Neto JF, Passos MC, Lisboa PC. Short and long-term effects of maternal nicotine exposure during lactation on body adiposity, lipid profile and thyroid function of rat offspring. *J Endocrinol.* 2009. 202:397-405.
- Oliveira E, Pinheiro CR, Santos-Silva AP, Trevenzoli IH, Abreu-Villaça Y, Nogueira Neto JF, Reis AM, Passos MC, Moura EG, Lisboa PC. Nicotine exposure affects mother's and pup's nutritional, biochemical, and hormonal profiles during lactation in rats. *J Endocrinol.* 2010a. 205 (2):159-70.
- O'Neill MF, Dourish CT, Iversen SD. Evidence for an involvement of D1 and D2 dopamine receptors in mediating nicotine-induced hyperactivity in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 1991. 104(3):343-50.
- Ozokutan BH, Ozkan KU, Sari I, Inanç F, Guldur ME, Kiliç M. Effects of maternal nicotine exposure during lactation on breast-fed rat pups. *Biol Neonate.* 2005. 88:113-17.
- Palm S, Momeni S, Lundberg S, Nylander I, Roman E. Risk-assessment and risk-taking behavior predict potassium- and amphetamine-induced dopamine response in the dorsal striatum of rats. *Front Behav Neurosci.* 2014. 8:236.
- Palmiter RD. Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: lessons from dopamine-deficient mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2008. 1129:35-46.
- Palou M, Priego T, Sánchez J, Palou A, Picó C. Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance. *Nutr Metab.* 2010. 7:69.

Parrott AC and Murphy RS. Explaining the stress-inducing effects of nicotine to cigarette smokers. *Hum Psychopharmacol*. 2012. 27(2):150-5.

Parrott AC. Cigarette-derived nicotine is not a medicine. *World J Biol Psychiatry*. 2003. 4(2):49-55.

Pascoli V, Turiault M, Lüscher C. Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature*. 2011. 48: 71–75.

Paxinos G and Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed). Sydney, Academic Press, 1998.

Pelissier AL, Gantenbein M, Bruguerolle B. Nicotine-induced perturbations on heart rate, body temperature and locomotor activity daily rhythms in rats. *J Pharm Pharmacol*. 1998. 50:929–34.

Peña-Oliver Y, Buchman VL, Stephens DN. Lack of involvement of alpha-synuclein in unconditioned anxiety in mice. *Behav Brain Res*. 2010. 209(2):234-40.

Pinheiro CR, Oliveira E, Trevenzoli IH, Manhães AC, Santos-Silva AP, YounesRapoza V, Claudio-Neto S, Santana AC, Nascimento-Saba CCA, Moura EG, Lisboa PC. Developmental plasticity in adrenal function and leptina production primed by nicotine exposure during lactation:gender differences in rats. *Horm Metab Res*. 2011. 43: 693–701.

Pitts SM and Horvitz JC. Similar effects of D1/D2 receptor blockade on feeding and locomotor behavior. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000. 65:433–38.

Polańska K, Hanke W, Sobala W, Ligocka D, Lowe J. Environmental tobacco smoke exposure in pregnancy and postpartum period. *Przegl Lek*. 2006. 3:907-10.

Prut L and Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003. 463(1-3):3-33.

Rada P, Avena NM, Hoebel BG. Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience*. 2005. 134:737–44.

Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci*. 2008. 29(10):493-8.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr*. 1993. 123: 1939–51.

Reinehr T, Isa A, Souza G, Dieffenbach R, Andler W. Thyroid hormones and their relation to weight status. *Horm Res*. 2008. 70: 51–57.

Reinehr T, Souza G, Andler W. Hyperthyrotropinemia in obese children is reversible after weight loss is not related to lipids. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006. 91: 3088–91.

Réus GZ, Dos Santos MA, Abelaira HM, Quevedo J. Animal models of social anxiety disorder and their validity criteria. *Life Sci.* 2014. 114:1-3.

Rodgers RJ and Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav.* 1997. 21(6):801-10.

Rodgers RJ, Cole JC, Cobain MR, Daly P, Doran PJ, Eells JR, Wallis P. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. *Behav Pharmacol.* 1992. 3:621-34.

Rodgers RJ, Nikulina EM, Cole JC. Dopamine D1 and D2 receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994. 49(4):985-95.

Romero RD and Chen WJ. Gender-related response in open-field activity following developmental nicotine exposure in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004. 78(4):675-81.

Rosemberg J. *Nicotina Droga Universal*. Ed. INCA – Ministério da Saúde – Brasil, 2004.

Rosemberg, A.M. *Implicações do Tabagismo na saúde da Mulher*. Disponível em: <www.inca.gov.br/tabagismo/jovem/gravidez> 2002.

Saint-Cyr JA, Taylor AE, Nicholson K. Behavior and the basal ganglia. *Adv Neurol.* 1995. 65:1–28.

Santiago SE and Huffman KJ. Prenatal nicotine exposure increases anxiety and modifies sensorimotor integration behaviors in adult female mice. *Neurosci Res.* 2014. 79:41-51.

Santos-Silva AP, Moura EG, Pinheiro CR, Rios AS, Abreu-Villaça Y, Passos MC, Oliveira E, Lisboa PC (2010) Neonatal nicotine exposure alters leptin signaling in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in the late postnatal period and adulthood in rats. *Life Sci.* 2010. 87:187-95.

Santos-Silva AP, Oliveira E, Pinheiro CR, Nunes-Freitas AL, Abreu-Villaça Y, Santana AC, Nascimento-Saba CC, Nogueira-Neto JF, Reis AM, Moura EG, Lisboa PC. Effects of tobacco smoke exposure during lactation on nutritional and hormonal profiles in mothers and offspring. *J Endocrinol.* 2011. 209(1):75-84.

Santos-Silva AP, Oliveira E, Pinheiro CR, Santana AC, Nascimento-Saba CC, Abreu-Villaça Y, Moura EG, Lisboa PC. Endocrine effects of tobacco smoke exposure during lactation in weaned and adult male offspring. *J Endocrinol.* 2013. 218:13-24.

Sherwood NM and Timiras PS. *A stereotaxic atlas of the developing rat brain*. University of California Press, Berkeley, 1970.

Shiffman S, Hickcox M, Paty JA, Gnys M, Kassel JD, Richards TJ. Progression from a smoking lapse to relapse: prediction from abstinence violation effects, nicotine dependence, and lapse characteristics. *J Consult Clin Psycho.* 1996. 64: 993–1002.

Silva LR. *Farmacoterapia pediátrica*. In Silva P ed. *Farmacologia*. 6a ed. 1205-1219, 2002.

Skibicka KP and Dickson SL. Enteroendocrine hormones - central effects on behavior. *Curr Opin Pharmacol.* 2013.13:977-82.

Skjei KL and Markou A. Effects of repeated withdrawal episodes, nicotine dose, and duration of nicotine exposure on the severity and duration of nicotine withdrawal in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2003. 168(3):280-92.

Slawecki CJ, Gilder A, Roth J, Ehlers CL. Increased anxiety-like behavior in adult rats exposed to nicotine as adolescents. *Pharmacol Biochem Behav.*2003. 75(2):355-61.

Slotkin TA, Tate CA, Cousins MM, Seidler FJ. Prenatal nicotine exposure alters the responses to subsequent nicotine administration and withdrawal in adolescence: serotonin receptors and cell signaling. *Neuropsychopharmacology.* 2006. 31:2462–75.

Slotkin TA. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicol Teratol.* 2002. 24:369–84.

Smith LN, McDonald CG, Bergstrom HC, Brielmaier JM, Eppolito AK, Wheeler TL, Falco AM, Smith RF. Long-term changes in fear conditioning and anxiety-like behavior following nicotine exposure in adult versus adolescent rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006. 85: 91–7. Sobrian SK, Marr L, Ressler K. Prenatal cocaine and/or nicotine exposure produces depression and anxiety in aging rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003. 27:501–18.

Somm E, Schwitzgebel VM, Vauthay DM, Aubert ML, Hüppi PS. Prenatal nicotine exposure and the programming of metabolic and cardiovascular disorders. *Mol Cell Endocrinol.* 2009. 304: 69–77.

Somm E, Schwitzgebel VM, Vauthay DM, Camm EJ, Chen CY, Giacobino JP, Sizonenko SV, Aubert ML, Hüppi PS. Prenatal nicotine exposure alters early pancreatic islet and adipose tissue development with consequences and the control of body weight and glucose metabolism later in life. *Endocrinology.* 2008.149: 6289- 99.

Sowan NA and Stember ML. Effect of maternal prenatal smoking on infant growth and development of obesity. *J Perinat Educ.* 2000. 3: 22–29.

Stellman SD and Djordjevic MV. Monitoring the tobacco use epidemic II: The agent: Current and emerging tobacco products. *Prev Med.* 2009. 48:S11-15.

Stolerman IP, Fink R, Jarvik ME. Acute and chronic tolerance to nicotine measured by activity in rats. *Psychopharmacology.* 1973. 30:329–42.

Swanson CJ, Heath S, Stratford TR, Kelley AE. Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens sub regions in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997. 58:933–45.

Taha SA. Preference or fat? Revisiting opioid effects on food intake. *Physiol Behav.* 2010. 100:429–37.

Thapar A, Fowler T, Rice F, Scourfield J, van den Bree M, Thomas H, Harold G, Hay D. Maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in offspring. *Am J Psychiatry*. 2003. 160(11):1985-99.

Toschke AM, Koletzko B, Slikker W Jr, Hermann M, von Kries R. Childhood obesity is associated with maternal smoking in pregnancy. *Eur J Pediatr*. 2002.161: 445-48.

Trauth JA, Seidler FJ, Slotkin TA. An animal model of adolescent nicotine exposure: effects on gene expression and macromolecular constituents in rat brain regions. *Brain res*. 2000. 867 29-39.

Vaglenova J, Birru S, Pandiella NM, Breese CR. An assessment of the long-term developmental and behavioral teratogenicity of prenatal nicotine exposure. *Behav Brain Res*. 2004. 150(1-2):159-70.

Vargas SN, Onishi LO, Hashimoto SM, Kikuchi R, Toledo LGM, Koike A, Carmo DR, Paoliello MMB, Matsuo T. A história familiar e a prevalência de dependência de álcool e tabaco em área metropolitana na região Sul do Brasil. *Revista de Psiquiatria Clínica*.1999.3:26.

Vargas SO, Onishi LO, Hashimoto M, Kikuchi R, de Toledo LOM, Koike A, do Carmo Vik T, Jacobsen G, Vatten L, Bakketeig LS. Pre- and post-natal growth in children of women who smoked in pregnancy. *Early Hum Dev*. 1996. 45: 245–55.

Vinay L, Ben-Mabrouk F, Brocard F, Clarac F, Jean-Xavier C, Pearlstein E, Pflieger JF. Perinatal development of the motor systems involved in postural control. *Neural Plasticity*. 2005. 12 131-9.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Franceschi D, Wong C, Gatley SJ, Gifford AN, Ding YS, Pappas N. "Nonhedonic" food motivation in humans involves dopamine in the dorsal striatum and methylphenidate amplifies this effect. *Synapse*. 2002. 44(3):175-80.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Telang F, Baler R. Addiction: Decreased reward sensitivity and increased expectation sensitivity conspire to overwhelm the brain's control circuit. *Bioessays*. 2010. 32(9): 748–55.

Volpicelli JR, Ulm RR, Hopson N. Alcohol drinking in rats during and following morphine injections. *Alcohol*. 1991. 8:289– 92.

von Kries R, Toschke AM, Koletzko B, Slikker W. Maternal smoking during pregnancy and childhood obesity. *Am J Epidemiol*. 2002.156: 954–61.

Wang GJ, Volkow ND, Fowler JS. The role of dopamine in motivation for food in humans: implications for obesity. *Expert Opin Ther Targets*. 2002. 6:601–09.

Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, Netusil N, Fowler JS. Brain dopamine and obesity. *Lancet*. 2001. 357:354–57.

Watkins SS, Koob GF, Markou A. Neural mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal. *Nicotine Tob Res.* 2000. 2 (1):19-37.

Wei J, Wang J, Dwyer JB, Mangold J, Cao J, Leslie FM, Li MD. Gestational nicotine treatment modulates cell death/survival-related pathways in the brains of adolescent female rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2011. 14: 91–106.

Westerink BH, Tuntler J, Damsma G, Rollema H, de Vries JB. The use of tetrodotoxin for the characterization of drug-enhanced dopamine release in conscious rats studied by brain dialysis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1987. 336(5):502-07.

WHO Report on the global tobacco epidemic – Implementing smoke-free environments. Geneva, World Health Organization, 2009.

Wideroe M, Vik T, Jacobsen G, Bakketeig LS. Does maternal smoking during pregnancy cause childhood overweight? *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2003.17(2):171-9.

Wills TA, Vaccaro D, McNamara G. Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *J Subst Abuse.* 1994. 6(1):1-20.

Winzer-Serhan UH. Long-term consequences of maternal smoking and developmental chronic nicotine exposure. *Front. Biosci.* 2008 13: 636–49.

Worsley JN, Moszczynska A, Falardeau P, Kalasinsky KS, Schmunk G, Guttman M, Furukawa Y, Ang L, Adams V, Reiber G, Anthony RA, Wickham D, Kish SJ. Dopamine D1 receptor protein is elevated in nucleus accumbens of human, chronic methamphetamine users. *Mol Psychiatry.* 2000. 5:664-72.

Yin HH and Knowlton BJ. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci.* 2006. 7(6): 464–76.

Yoshimoto K, McBride WJ, Lumeng L, Li TK. Ethanol enhances the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens of HAD and LAD lines of rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1992. 16(4):781-85.

Younes-Rapozo V, Moura EG, Manhães AC, Pinheiro CR, Santos-Silva AP, de Oliveira E, Lisboa PC. Maternal nicotine exposure during lactation alters hypothalamic neuropeptides expression in the adult rat progeny. *Food Chem Toxicol.* 2013. 58:158-68

Zarrindast MR, Aghamohammadi-Sereshki A, Rezayof A, Rostami P. Nicotine induced anxiogenic-like behaviours of rats in the elevated plus-maze: possible role of NMDA receptors of the central amygdala. *J Psychopharmacol.* 2012. 26:555–63.

Zarrindast MR, Sroushi A, Bananej M, Vousooghi N, Hamidkhaniha S. Involvement of the dopaminergic receptors of the rat basolateral amygdala in anxiolytic-like effects of the cholinergic system. *Eur J Pharmacol.* 2011. 672(1-3):106-12.

Zemlan FP, Hitzemann RJ, Hirschowitz J, Garver DL. Down-regulation of central dopamine receptors in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 1985.142(11):1334-7.

Zor T and Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem.* 1996. 236(2):302-8.

Zuckerman M and Kuhlman DM. Personality and risk-taking: common biosocial factors *J Pers Review.* 2000. 68(6):999-1029.