



Bruna Corral Garcia Valsoni

**“EFEITOS DO TABAGISMO PASSIVO ASSOCIADO AO EXERCÍCIO
FÍSICO DURANTE PRENHEZ E LACTAÇÃO”**

Presidente Prudente

2010

Bruna Corral Garcia Valsoni

**EFEITOS DO TABAGISMO PASSIVO ASSOCIADO AO EXERCÍCIO
FÍSICO DURANTE PRENHEZ E LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia - FCT/Unesp, Campus de Presidente Prudente, para obtenção do título de mestre no programa de pós-graduação em fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho



Presidente Prudente

2010

V285e Valsoni, Bruna Corral Garcia.
Efeitos do tabagismo passivo associado ao exercício físico durante prenhez e lactação / Bruna Corral Garcia Valsoni. - Presidente Prudente, 2010
XX f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia
Orientador: José Carlos Silva Camargo Filho
Banca: Alessandra Choqueta de Toledo, Nilton Mazzer

1. Tabagismo Passivo. 2. Exercício Físico. 3. Prenhez.
4. Lactação. I. Autor. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. III. Título.

CDD 615.8

SUMÁRIO

Dedicatória.....	04
Agradecimentos	06
Epígrafe.....	09
Apresentação	11
INTRODUÇÃO	13
ARTIGO I	18
ARTIGO II	46
CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO I.....	79
ANEXO II.....	90
ANEXO III.....	105
ANEXO IV	130

Dedicatória

Dedico esta Dissertação ao meu marido, aos meus pais e amigos.

Agradecimientos

Agradeço, primeiramente, a Jesus Cristo, meu Mestre, que me proporcionou a oportunidade de aprender e crescer um pouco mais, sempre presente ao meu lado, me mostrando o caminho a seguir e nunca me deixando desistir frente aos obstáculos encontrados. Quando caí, Ele me levantou e me sustentou em seus fortes braços, me deu paz e força para seguir.

Ao meu marido, Eduardo, por toda compreensão, amor e paciência diante das dificuldades, também por me incentivar a ir em frente e lutar pelo meu sonho. Esta conquista é dele também, pois somos um.

A minha mãe, Maria Irany, que mesmo ausente, foi presente em todos os momentos pelos seus ensinamentos, que vão perdurar para sempre em meu coração.

Ao meu pai, Marcos, por se preocupar comigo, me apoiar, me dar carinho e condições para continuar. Sem sua ajuda e dedicação não chegaria até aqui.

Ao meu orientador, mestre, amigo, pai, padrinho, Zeca, por primeiramente ter depositado sua confiança em mim e ter me proporcionado condições para crescer, tanto cientificamente e em conhecimento, mas também como pessoa.

A minha professora, co-orientadora, amiga, mãe, madrinha, Rê, que sempre brincando, com bom humor, me ensinou, me aconselhou e me ajudou a me tornar uma pessoa e uma profissional melhor.

Ao técnico do laboratório, amigo, irmão, Sidney, pela força e colaboração na execução deste trabalho. Mesmo em dias difíceis, sempre com uma palavra amiga, de ânimo e coragem.

Aos amigos do LAPMUS, Mariana, Fábio, Alice e Jacqueline, pelo companheirismo e colaboração na realização deste trabalho. Não me esquecerei dos finais de semana, feriados e dos dias sem almoçar dedicados a me ajudar.

Aos professores e amigos, Dr. Luiz Carlos e Dra. Alessandra, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pelas dicas, conselhos e correções.

As amigas do laboratório de Fisiologia do Estresse, Tatiana, Ana Clara, Isadora e Renata, pela amizade, pelas risadas, pelas lágrimas, pelas bolachas, café, chá...

Aos amigos da INJ, Jú, Elô, Rafa, Drica, Naty, Paula, Dani e respectivos, pelas orações, torcida e apoio em todos os momentos.

Aos familiares, avós, tios e primos, que mesmo distantes estavam torcendo por mim.

A Coordenação do Programa de Mestrado em Fisioterapia da FCT/UNESP pelo apoio durante a realização deste trabalho e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Pró-Reitoria de Administração e Planejamento (PROAP) pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais um capítulo de minha história.

Epígrafe

“Mas Deus escolheu as coisas loucas deste mundo para confundir as sábias; e Deus escolheu as coisas fracas deste mundo para confundir as fortes.”

I Coríntios 1:27

(Bíblia Sagrada)

Apresentação

Esta dissertação é composta de uma introdução e de dois artigos científicos, originados de pesquisas realizadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Fisioterapia da FCT/UNESP – Presidente Prudente.

Em consonância com as regras do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, os artigos foram redigidos de acordo com as normas dos periódicos Brazilian Journal of Medical and Biological Research (Anexo I) e Pediatric Research (Anexo II), sendo os dois manuscritos submetidos na língua inglesa (Anexos III e IV).

- Artigo I.

Valsoni BCG, Bonfim MR, Kodama FY, Camargo RCT, Camargo Filho JCS. Efeitos do tabagismo passivo associado ao exercício físico na musculatura esquelética de ratas durante prenhez e lactação. Submetido à apreciação visando publicação no periódico Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

- Artigo II.

Valsoni BCG, Bonfim MR, Kodama FY, Urban JB, Camargo RCT, Vanderlei LCM, Camargo Filho JCS. Influência do tabagismo passivo associado ao exercício físico realizado por ratas durante prenhez e lactação sobre o desenvolvimento de seus filhotes do nascimento ao desmame. Submetido à apreciação visando publicação no periódico Pediatric Research.

Introdução

O tabagismo passivo caracteriza-se pela inalação da fumaça lateral produzida pela queima lenta da extremidade do cigarro entre as tragadas e pela inalação da fumaça central, exalada pelo fumante ativo¹. A fumaça lateral pode conter seis vezes mais nicotina, quatro vezes mais alcatrão, sete vezes mais monóxido de carbono e 73 vezes mais amônia que a fumaça inalada pelo fumante ativo. No entanto, um fumante passivo acaba por inalar menos componentes do cigarro, ainda que prejudiciais, devido à diluição progressiva da fumaça no ar².

Na fumaça de cigarro, composta por gases e partículas, é encontrada mais de quatro mil substâncias químicas³, dentre elas a nicotina, que por sua vez possui propriedades que alteram o metabolismo do fumante. Dentre seus efeitos no organismo estão o aumento da frequência cardíaca, pressão arterial⁴, taxa metabólica, produção de calor, secreção do hormônio tireoidiano, secreção gástrica, do consumo de oxigênio, e diminuição da concentração sérica de ácido ascórbico, ingestão alimentar, do peso corporal, além de alteração nos níveis de glicose e colesterol sanguíneo⁵.

No mundo mais de um bilhão de pessoas são fumantes, sendo o tabagismo a principal causa de morte evitável, além de ser responsável por 90% dos tumores pulmonares, 75% das bronquites crônicas e 25% das doenças isquêmicas do coração⁶. No Brasil, aproximadamente de um terço da população adulta tem o vício de fumar, sendo aproximadamente 11,2 milhões de mulheres, em sua maioria na idade reprodutiva, entre 20 e 49 anos⁷. Este fato se faz preocupante, pois o tabagismo interfere na função reprodutora das mulheres no período pré-concepção, na evolução da gravidez e na lactação⁸.

O tabagismo durante a gestação provoca déficit do crescimento do feto, levando ao maior risco de prematuridade, aborto espontâneo e baixo peso ao

nascer, sendo que este risco é aumentado proporcionalmente ao consumo de cigarros⁹. Além disso, são observados os efeitos prejudiciais do tabagismo no desenvolvimento do lactente, pois a nicotina age diminuindo a concentração do hormônio prolactina na circulação materna, sendo este o responsável pela produção do leite⁸.

Devido à conscientização das gestantes quanto aos efeitos nocivos do cigarro, durante o período de gestação, a mulher tende a interromper o hábito de fumar, a diminuir o número de cigarros fumados, ou a parar de fumar definitivamente¹⁰. Entretanto, aproximadamente 35% das gestantes ainda continuam fumando durante toda a gravidez e o período de amamentação¹¹.

Também deve ser considerado, que várias mulheres mesmo parando de fumar no período gestacional, continuam frequentando ambientes fechados poluídos por fumaça de cigarro, como ambientes de trabalho, lazer, escolas e demais espaços públicos fechados⁶. Já outras gestantes são expostas à fumaça de cigarro em seu próprio domicílio por conviver com o companheiro que possui o hábito de fumar. Dessa maneira, a gestante passa a ser fumante passiva por inalar a fumaça lateral, sendo este fato verificado por Rozov¹² em 33,3% das gestantes.

Por outro lado, gestantes buscam no exercício físico um estilo de vida mais saudável, com o intuito de promover o controle de ganho de peso, uma vez que em excesso torna-se um fator de risco importante na gravidez, levando ao desenvolvimento de patologias como hipertensão arterial, diabetes, obesidade pós-parto, entre outras^{13,14}.

Dentre outros benefícios, o exercício físico atenua e previne a dor lombar causada pelo aumento da lordose, decorrente da expansão do útero na cavidade abdominal e consequente mudança do centro de gravidade, do ganho de peso

corporal, e também, alivia as câibras nas pernas e a fadiga muscular. Como efeito do exercício, obtém-se uma melhor adaptação à nova postura, além de um incremento na agilidade e na habilidade para a realização das atividades de vida diária^{13,14}. No âmbito cardiovascular encontram-se alterações favoráveis com a prática de exercício físico, como frequência cardíaca e pressão arterial mais baixa, maior volume sanguíneo e aumento da capacidade de oxigenação, dessa forma prevenindo trombose e varizes¹³.

Além dos benefícios que o exercício físico promove para a gestante, encontramos os relacionados com o maior peso fetal e do recém-nascido, bem como com o menor risco de aborto, menor índice de parto prematuro e de cesarianas¹⁴.

Entretanto, sabe-se que a prática de exercício físico também está associada à ocorrência de adaptações na musculatura esquelética, as quais incluem modificações nas suas características metabólicas e estruturais, levando também ao aparecimento de processos inflamatórios decorrente de micro traumas¹⁵.

O cigarro também é responsável por processos inflamatórios que prejudicam o músculo esquelético, pelo fato da nicotina induzir estresse oxidativo, que produz radicais livres, que por sua vez agredem a camada lipídica da membrana celular^{16,17}. A nicotina, também, induz alterações nas propriedades das fibras musculares, especialmente em fibras altamente oxidativas, e dessa maneira, reduzindo o número de fibras tipo I e aumentando o do tipo IIb¹⁸.

Diante do exposto, que o exercício físico durante a gestação e amamentação promove benefícios tanto para a mãe quanto para o feto e recém-nascido, e que em contrapartida o tabagismo passivo provoca danos para ambos, pretende-se analisar os efeitos do tabagismo passivo, associado ao exercício físico por meio da natação, nos músculos sóleo e gastrocnêmio durante prenhez e lactação de ratas, bem como

avaliar a influência sobre o número de filhotes por rata e sobre o peso e o comprimento de seus filhotes ao nascer e no desenvolvimento pós-parto até o desmame.

Artigo I

EFEITOS DO TABAGISMO PASSIVO ASSOCIADO AO EXERCÍCIO FÍSICO NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATAS DURANTE PREENHEZ E LACTAÇÃO.

B.C.G. Valsoni¹, M.R. Bonfim¹, F.Y. Kodama¹, R.C.T. Camargo¹, J.C.S. Camargo Filho¹

¹Laboratório de Histologia, Departamento de Fisioterapia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (FCT/UNESP), Presidente Prudente, SP, Brasil.

Título Resumido: Tabagismo passivo e exercício físico na prenhez e lactação

Palavras-chave: Tabagismo Passivo, Exercício Físico, Prenhez, Lactação, Músculo Esquelético, Histologia.

Apoio financeiro: CAPES

Endereço para Correspondência:

J.C.S. Camargo Filho, Departamento de Fisioterapia, FCT / UNESP, Rua Roberto Simonsen, 305, 19060-900 Presidente Prudente, SP, Brasil.

Fax: (18) 3229-5353

E-mail: camargo@fct.unesp.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do tabagismo passivo, associado ao exercício físico por meio da natação, nos músculos sóleo e gastrocnêmio durante a prenhez e lactação de ratas. 24 ratas foram divididas em: GF (exposto à fumaça de cigarro), GC (controle), GFN (submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro) e GN (submetido ao programa de natação). No primeiro dia da prenhez iniciou-se o protocolo de exposição à fumaça de cigarro, constituído por 30 minutos, duas vezes ao dia, durante seis semanas. Neste mesmo período foi iniciado o programa de natação, que teve duração de 60 minutos diários até o 21º dia de amamentação. Foram obtidos os músculos sóleo e gastrocnêmio para as análises histológica, histoquímica, morfométrica e tipagem das fibras. Na histologia, os grupos GF e GFN apresentaram infiltrados inflamatórios, fibras fagocitadas e necrosadas, núcleos centralizados, splittings e enrodilhamento; no GN observou-se alterações referentes à adaptação ao exercício, infiltrados, lesão sarcolemal, fibras polimórficas, atróficas e angulares. Na análise histoquímica dos grupos GF e GFN houve ausência da atividade enzimática e agregados amorfos de formazana em posição subsarcolemal; no GN verificou-se as mesmas alterações em menor frequência e intensidade. Com relação à medida do menor diâmetro das fibras musculares não houve diferença significativa entre os grupos, assim como na frequência dos tipos de fibras do gastrocnêmio. Conclui-se que, o exercício físico intensificou as alterações morfológicas e histoquímicas causadas pela nicotina, entretanto não influenciou a medida de menor diâmetro das fibras musculares, nem os tipos de fibras.

Introdução

O tabagismo passivo caracteriza-se pela inalação da fumaça lateral, produzida pela queima lenta da extremidade do cigarro entre as tragadas, e pela inalação da fumaça central, exalada pelo fumante ativo¹. A fumaça lateral é uma mistura complexa composta por mais de 5000 componentes químicos, que apresentam concentrações até dez vezes maiores de nicotina, alcatrão e monóxido de carbono do que a fumaça inalada pelo fumante ativo. No entanto, um fumante passivo acaba por inalar menos componentes do cigarro, ainda que prejudiciais, devido à diluição progressiva da fumaça no ar².

Quando este fumante passivo se trata de uma gestante, os prejuízos vão além, pois a exposição à fumaça de cigarro é causa substancial de morbidade e mortalidade fetal³, assim como fator responsável pelo retardo do desenvolvimento do lactente⁴. Nos últimos anos, vários trabalhos tem relatado apenas as consequências do tabagismo passivo materno para o feto e recém-nascido^{4,5,6}, mas pouco se sabe sobre as consequências para a gestante.

Durante o período gestacional a mulher busca um estilo de vida mais saudável com uma alimentação mais equilibrada e a prática de exercício físico, pois esta promove melhora da condição cardiorespiratória, controle de ganho de peso⁷, além de prevenir patologias como hipertensão arterial, diabetes, obesidade pós-parto⁸.

No âmbito musculoesquelético, os benefícios do exercício físico são: aliviar as câibras nas pernas e a fadiga muscular, melhorar a agilidade e a habilidade na realização das atividades de vida diária, atenuar e prevenir a dor lombar causada pelo aumento da lordose^{7,8}.

Por outro lado, sabe-se que a prática de exercício físico também está associada à ocorrência de adaptações na musculatura esquelética, as quais incluem modificações nas suas características metabólicas e estruturais, levando também ao aparecimento de processos inflamatórios decorrente de micro traumas⁹.

Estudos^{10,11} relacionam dados obtidos em análises histopatológicas, como ocorrências de processo inflamatório em segmentos de fibras musculares, com o tabagismo, justificado pelo fato da nicotina induzir estresse oxidativo, que produz radicais livres, que por sua vez agridem a camada lipídica da membrana celular. A fumaça de cigarro, também, induz alterações nas propriedades das fibras musculares, especialmente em fibras altamente oxidativas, dessa maneira, reduzindo o número de fibras tipo I e aumentando o de tipo IIb¹².

A partir dos efeitos inflamatórios da musculatura esquelética, decorrentes da nicotina contida na fumaça de cigarro, como fator de risco para a gestante em ambientes fechados, e dos efeitos benéficos proporcionados pelo exercício físico, o qual tem sido amplamente procurado pelas mulheres durante a gestação e amamentação, pretende-se investigar os efeitos protetores do exercício físico sobre os músculos esqueléticos.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do tabagismo passivo, associado ao exercício físico por meio da natação, nos músculos sóleo e gastrocnêmio durante a prenhez e lactação de ratas.

Material e método

Este estudo utilizou o procedimento técnico experimental aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP – Campus de Presidente Prudente, sob o Processo nº 24/2009, sendo seguidos os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Animais e desenho experimental

Para tal, foram utilizadas 24 ratas virgens em idade reprodutiva (90 dias) e oito ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albina, Rodentia, Mammalia), mantidos em gaiolas individuais, sob temperatura média de 22 ± 2 °C, umidade de $50 \pm 10\%$, ciclo

claro/escuro de 12 horas (7-19h) e tiveram livre acesso à água e ração padrão da marca Primor[®].

Com o objetivo de homogeneizar os grupos as 24 ratas virgens foram submetidas a um esfregaço vaginal para verificação da fase do ciclo estral e em seguida alocadas por proximidade das fases em quatro grupos com seis animais cada, sendo: GF (expostos a fumaça de cigarro), GC (controle), GFN (submetido ao programa de natação e expostos a fumaça de cigarro) e GN (submetido ao programa de natação). A fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro e diestro) foi determinada pela análise da celularidade vaginal, realizada por meio de um esfregaço diário entre 13 e 15 horas.

A verificação do ciclo estral foi realizada por mais uma semana após a divisão dos grupos e ao detectar o início da fase fértil (estro), as ratas foram colocadas em gaiolas individuais com um rato macho, onde permaneceram por uma noite para a cópula. Na manhã seguinte, a prenhez foi diagnosticada pela presença de espermatozóide no esfregaço vaginal, o que caracterizou o dia zero da prenhez⁵.

Protocolo de exposição à fumaça de cigarro

No primeiro dia da prenhez foi iniciado o protocolo de exposição à fumaça de cigarro, o qual foi dividido em duas fases: primeira, fase de adaptação, compreendida pelos cinco primeiros dias, onde os animais dos grupos GF e GFN foram expostos à fumaça de cigarro na câmara de fumo a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ¹³, durante 10 minutos, uma vez ao dia, com 250 ppm (partes por milhão) de CO (monóxido de carbono) medido pelo detector de gás específico TxiPro[®] da Biosystems. A segunda fase ou fase experimental, passou a durar 30 minutos, duas vezes ao dia (manhã e tarde), seis dias por semana, com 350 ppm de CO por exposição¹⁴.

Os animais dos grupos GC e GN foram submetidos à inalação de ar comprimido, com as mesmas características de tempo e periodicidade dos animais expostos ao fumo.

Para a realização deste protocolo foram utilizadas duas câmaras hermeticamente fechadas, uma para os grupos GF e GFN com inalação de fumaça de cigarro e a segunda para os animais dos grupos GC e GN com inalação somente de ar comprimido. A câmara para inalação de fumaça era dividida em dois compartimentos, um para a colocação de cigarros acesos, e outro destinado à exposição da gaiola com seis animais, sendo adaptada segundo o modelo de inalação descrito por Cendon Filha¹⁵.

Foram utilizados cigarros, adquiridos comercialmente, compostos por: mistura de fumos, açúcares, papel de cigarro, extratos vegetais e agentes de sabor, que produziram em cada queima: 10mg de alcatrão, 0,9mg de nicotina e 10mg de monóxido de carbono, conforme relatado na embalagem do produto.

Protocolo do programa de natação

No primeiro dia da prenhez foi iniciado o programa de natação, como descrito por Volpato et al.¹⁶, em um tanque contendo água a 30°C, no nível de 40 cm com o intuito de não permitir o apoio da calda das ratas no fundo do tanque, tendo assim o estímulo para nadar.

Este programa foi dividido em duas fases: a primeira, fase de adaptação ao treinamento, caracterizada pelas cinco primeiras sessões de natação com aumento progressivo de 10 minutos de duração por dia, começando com 20 minutos e chegando à quinta sessão com 60 minutos. A segunda, fase de treinamento, foi iniciada na sexta sessão mantendo-se o tempo de duração de 60 minutos até a 36^a sessão. As sessões de natação foram diárias, sem interrupção, no período da manhã, por seis dias da semana durante seis semanas, e no caso dos grupos GFN após a exposição à fumaça de cigarro.

Os animais dos grupos GF e GC foram submetidos às mesmas condições do programa de natação, entretanto com água a 10 cm por 15 minutos, para que sofressem o mesmo estresse do meio, entretanto evitando o treinamento físico por meio da natação.

Tanto o protocolo de exposição à fumaça de cigarro, quanto o programa de natação terminaram no 21º dia de lactação.

Coleta do material

As 24 ratas fêmeas ratas foram pesadas antes da cópula e no dia da eutanásia, sendo esta mediante decapitação por guilhotina no 21º dia de lactação. Após o respectivo sacrifício, foi iniciado o procedimento cirúrgico para a retirada do músculo sóleo e gastrocnêmio do membro pélvico esquerdo, os quais foram pesados. As amostras do músculo gastrocnêmio foram obtidas por meio de um corte transversal próximo da sua origem, especificamente na cabeça medial do respectivo músculo.

Análise histológica

Os fragmentos dos músculos foram congelados pelo método de congelamento de tecido não fixado e armazenados em botijão de nitrogênio a -180°C. A partir dos fragmentos congelados foram confeccionadas lâminas com cortes transversais de 6µm a -20°C, que posteriormente foram coradas pelo método Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação qualitativa das seguintes características do músculo sóleo e gastrocnêmio: forma, tamanho, posição dos núcleos, fagocitose, aumento do endomísio e perimísio e splitting, em microscópio óptico Zeiss Jenapol (Carl Zeiss®)^{17,18}. A análise quantitativa das características morfológicas acima descritas foi feita a partir da análise de frequência, onde foi verificada nas lâminas de cada animal a presença ou ausência destas características¹⁹.

Análise Histoquímica

Para demonstração da atividade oxidativa-glicolítica dos tipos de fibras musculares, outras lâminas foram preparadas com o método da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Tetrazólio Reductase (NADH-TR), onde foi avaliado o teor de formazana no sarcoplasma das fibras musculares das lâminas, utilizando a técnica de Pearse modificada por Dubowitz e Brooke²⁰. Por este mesmo método foi realizada a tipagem das fibras musculares, sendo

diferenciadas as fibras do tipo I e II no músculo gastrocnêmio²¹, e posteriormente foi verificada a frequência dos tipos de fibras.

Medida do menor diâmetro das fibras musculares

As possíveis variações do tamanho das fibras musculares do sóleo e gastrocnêmio foram verificadas por meio de um sistema de análise por imagem computadorizada (NIS-Elements D3.0 - SP7 - Nikon®) das lâminas preparadas pelo método de NADH-TR. Em cada imagem com aumento 100x foram efetuadas as mensurações do menor diâmetro em todas as fibras musculares (μm), adaptado segundo Dubowitz & Brooke²⁰.

Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o software SPSS 17.0, aplicado o teste de Komolgorov-Smirnov, sendo verificada a normalidade destes foi utilizado o método estatístico descritivo com apresentação dos valores de médias seguidos de seus respectivos desvios padrões, e intervalo de confiança (95%). Para verificação de diferenças das variáveis entre os grupos estudados, foi utilizada a análise de variância (ANOVA - One Way) e pós-teste de Tukey. O teste T-pareado foi utilizado para comparação dos valores de peso inicial e final das ratas. Para todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

Peso corporal

A comparação do peso das ratas virgens antes da cópula mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos estudados ($p = 0,734$). Ao final do período de lactação, as ratas foram novamente pesadas e também não houve diferença significativa entre os grupos controle e experimentais ($p = 0,580$). Na comparação dos valores de peso inicial e final, foi verificada diferença significativa para os grupos GC ($p = 0,002$),

GFN ($p = 0,001$) e GN ($p = 0,040$), e somente o GF não apresentou diferença significativa ($p = 0,108$).

INSERIR TABELA 1

Peso muscular

A análise da comparação do peso dos músculos sóleo e gastrocnêmio entre os diferentes grupos estudados indicou que não houve diferença significativa, tanto para o músculo sóleo ($p = 0,9283$), como para o gastrocnêmio ($p = 0,3610$), entre os grupos experimentais e controle, conforme tabela 1.

Histologia muscular

A análise qualitativa das lâminas do músculo sóleo indicou que as ratas do GF apresentaram infiltrados inflamatórios, aumento de tecido endomisial e perimisial, fibras fagocitadas e necrosadas, mais de 10% de núcleos centralizados, muitas fibras polimórficas e arredondadas, além de vários splittings e enrodilhamento. O GC apresentou aspecto morfológico normal, padrão fascicular, a maioria das fibras poligonais, com algumas fibras polimórficas e atroficas. No grupo exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação (GFN) observaram-se alterações nas fibras como, por exemplo: fibras arredondadas, em processo de fagocitose e splittings, além de grande extensão de infiltrado inflamatório. As ratas do GN apresentaram aumento do endomísio e perimísio, fibras atroficas e angulares, poucos splittings, infiltrado inflamatório e lesão sarcolemal (Figura 1).

INSERIR FIGURA 1

No músculo gastrocnêmio a análise qualitativa mostrou alterações na forma das fibras musculares do GF, como fibras atroficas, hipertróficas, polimórficas, arredondadas e angulares; também foi observado aumento de tecido endomisial e perimisial, e fibras em processo de fagocitose e necrose. No GC verificou-se fibras com formato poligonal, núcleos

periféricos e padrão fascicular. As alterações histológicas encontradas no GFN foram: aumento do tecido endomisial e perimisial com infiltrado inflamatório, fibras atroficas e polimórficas e várias fibras fagocitadas. No grupo somente exercitado (GN), a análise das lâminas indicou que as ratas apresentaram alterações caracterizadas por aumento do endomísio e perimísio com presença de infiltrados inflamatórios e lesão sarcolemal, além de modificações nas fibras musculares, como fibras polimórficas, atroficas e angulares (Figura 1).

A tabela 2 mostra o resultado da análise quantitativa das alterações histológicas observadas nas fibras dos músculos: sóleo e gastrocnêmio das ratas de cada grupo. Os resultados mostram que os animais do GFN apresentaram a maior frequência de ocorrência de alterações histológicas, tanto no músculo sóleo, quanto no gastrocnêmio. Nos animais do GN as alterações encontradas foram mais relacionadas ao formato das fibras.

INSERIR TABELA 2

Histoquímica muscular

A análise das lâminas do músculo sóleo com reação de NADH-TR do GF indicou perda de atividade enzimática em algumas fibras, tanto na área central, quanto na periferia da fibra. No GC verificou-se padrão normal de reação para a maioria das fibras. O GFN apresentou distribuição irregular da reação para maioria das fibras, em algumas houve perda de reação, e em outras houve aumento da atividade enzimática com presença de agregados de formazana na posição subsarcolemal. O GN mostrou atividade reativa fraca na área central e subsarcolemal em algumas fibras, como também agregados amorfos de formazana em posição subsarcolemal, indicando a posição das mitocôndrias (Figura 2).

INSERIR FIGURA 2

Com relação à análise histoquímica do músculo gastrocnêmio verificou-se no GF ausência da atividade enzimática em várias fibras e em outras agregados amorfos de formazana em área central e subsarcolemal, a maioria em fibras oxidativas. No grupo controle (GC) observa-se padrão normal de reação para a maioria das fibras, sendo que em poucas delas foi observado aumento da atividade enzimática em posição subsarcolemal. O GFN apresentou padrão irregular de distribuição da reação de NADH-TR, com várias fibras indicando atividade reativa fraca na periferia. No GN houve perda de reação em poucas fibras e em outras presença de formazana em posição subsarcolemal (Figura 2).

Morfometria muscular

A análise de variância mostrou que não houve diferença estatística nos valores de menor diâmetro das fibras do músculo sóleo ($p = 0,2472$), das fibras tipo I do músculo gastrocnêmio ($p = 0,6669$), como das fibras tipo II ($p = 0,6053$) entre os grupos estudados, como observado na Tabela 3.

INSERIR TABELA 3

Tipagem das fibras musculares

Após a verificação da frequência dos tipos de fibras do músculo gastrocnêmio, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa do número de fibras do tipo I ($p = 0,5487$) e do tipo II ($p = 0,4734$) entre os grupos estudados. As frequências dos tipos de fibras encontradas para os grupos foram podem ser observadas na tabela 4.

INSERIR TABELA 4

Discussão

No presente estudo verificou-se que o peso corporal das ratas aumentou do período anterior à cópula para o vigésimo primeiro dia de lactação, entretanto para o GF este aumento

de peso não foi significativa, podendo ser justificado pelo efeito inibidor de apetite provocado pela nicotina, contida na fumaça do cigarro²². Por outro lado, não houve diferença entre os grupos no peso inicial, demonstrando homogeneidade antes do início dos protocolos.

Nosso achado com relação ao peso das ratas corrobora com o de Mello et al.⁵, ao verificarem a influência da exposição à fumaça lateral do cigarro sobre o ganho de peso de ratas gestantes, onde concluíram que a exposição ao tabaco reduziu o ganho de peso delas, sendo parte desse efeito devido ao estresse da manipulação.

Quanto ao peso dos músculos sóleo e gastrocnêmio, não foi observada diferença significativa entre os grupos, o que leva a inferir que a sobrecarga imposta pela gestação foi insuficiente para promover aumento de volume e hipertrofia muscular, assim como, o período de exposição à fumaça de cigarro foi insuficiente para reduzir a massa muscular das ratas. Fato semelhante foi observado por Nakatani et al.²³, quando avaliaram ratos machos Wistar-Kyoto por oito semanas com diferentes doses de inalação de fumaça de cigarro e constataram que não houve diferença de peso muscular destes com o grupo controle, independentemente da dosagem de exposição.

De maneira geral, o principal achado deste estudo está relacionado com a histologia e histoquímica dos músculos sóleo e gastrocnêmio, visto que em ambos os músculos foram verificadas maiores incidências de alterações nos grupos expostos à fumaça de cigarro. As alterações como infiltrados inflamatórios, aumento de tecido endomisial e perimisial, fibras fagocitadas e necrosadas, mais de 10% de núcleos centralizados, várias fibras polimórficas, atróficas e arredondadas, além de vários splittings e enrodilhamento refletem lesão muscular encontrada nos grupos expostos à fumaça de cigarro.

Um dos fatores de justificativa para a lesão muscular encontrada nos grupos expostos à fumaça pode estar relacionado com o efeito da nicotina contida na fumaça do cigarro, que promove uma ação vasoconstritora, além de liberar catecolaminas na circulação materna,

levando a hipóxia tecidual^{4,23}. Outro dado relevante está relacionado ao aumento da carboxihemoglobina (COHb) no sangue, que também diminui a oxigenação tecidual²³. Dessa forma, as fibras musculares das ratas em resposta ao possível baixo fornecimento de oxigênio podem sofrer algumas alterações como atrofia e fagocitose²⁰.

A nicotina, também, induz estresse oxidativo provocando um desequilíbrio no sistema oxidante/anti-oxidante das células, que por sua vez produz espécies reativas de oxigênio que agredem membrana lipídica. As citocinas pró-inflamatórias, em especial o TNF- α (fator de necrose tumoral) são responsáveis pela agressão da membrana celular, dessa maneira concentrações elevadas de TNF- α estão associadas com lesões musculares^{10,24}.

Quanto aos dados da análise histoquímica, observou-se nos grupos GF e GFN distribuição irregular do produto, com ausência de reação em várias partes das fibras, demonstrando diminuição da oxigenação tecidual, sendo a frequência maior deste fato observada no músculo sóleo e nas fibras oxidativas do músculo gastrocnêmio do GFN. Os resultados obtidos neste estudo vêm a confirmar estudos prévios tanto em animais^{23,25}, quanto em humanos¹¹, onde verificaram diminuição da capacidade oxidativa muscular.

As ratas que somente realizaram exercício físico durante a prenhez e lactação também apresentaram alterações na histologia e na histoquímica dos músculos sóleo e gastrocnêmio, apesar de demonstrarem menor frequência e intensidade. Estas alterações são adaptações normais da musculatura esquelética frente ao exercício físico, as quais incluem modificações nas suas características metabólicas e estruturais, além de processos inflamatórios decorrente de micro traumas²⁶; já as alterações mitocondriais encontradas neste grupo foram devidas ao aumento da demanda metabólica.

Os resultados histológicos e histoquímicos encontrados no grupo exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação mostraram grande semelhança aos resultados obtidos no grupo somente exposto à fumaça de cigarro, todavia o GFN apresentou maior

frequência e intensidade, mostrando dessa forma que o exercício físico intensificou as alterações sobre as fibras musculares dos animais expostos ao efeito da nicotina, pela somatização de estresses.

Sabe-se que, a demanda fisiológica aumentada, devido à prática de exercício físico, está relacionada com alterações no número e volume das fibras musculares, que são adaptações sofridas pelo músculo frente a uma sobrecarga, que leva a hipertrofia muscular²⁷. Com isso, esperava-se que as ratas que realizaram exercício físico, por meio da natação, com sobrecarga imposta pela prenhez apresentassem hipertrofia muscular.

Entretanto, este fato não foi observado nos músculos sóleo e gastrocnêmio, após seis semanas de 60 minutos de exercício diário, pois não houve diferença significativa dos valores de menor diâmetro das fibras musculares entre os grupos estudados. Assim, deve-se considerar que a sobrecarga imposta pelo ganho de peso, decorrente da evolução da prenhez, não foi suficiente para a ação de sobrecarga de treinamento necessária para proporcionar hipertrofia muscular, entretanto permitiu um processo de adaptação ao sistema de treinamento realizado pelas ratas.

Face a resposta muscular induzida pela exposição à fumaça de cigarro, Nakatani et al.²⁵ verificaram que para haver redução da área da secção transversa do músculo sóleo de ratos é preciso alta dosagem de fumaça de cigarro, entretanto em baixas dosagens não houve diferença significativa entre o grupo controle. O mesmo achado foi relatado em outro estudo utilizando o músculo EDL (extensor longo dos dedos) para as fibras tipo II²³. No presente estudo não foi observada redução do menor diâmetro das fibras dos músculos sóleo e gastrocnêmio nos grupos GF e GFN, apesar destes grupos terem apresentado um grande número de fibras atroficas. Dessa maneira, podemos inferir que a dosagem ou o tempo aplicado neste estudo foram insuficientes para influenciar significativamente o tamanho das fibras musculares.

Em um estudo realizado com indivíduos fumantes pôde-se verificar alterações na musculatura esquelética pela biópsia do músculo vasto lateral, caracterizada por atrofia de fibras tipo I e aumento da atividade glicolítica¹¹. Por outro lado, em estudos da área da secção transversal do quadríceps por imagem de ressonância magnética não foi observada diferença entre indivíduos fumantes e não-fumantes^{28,29}, mostrando que ainda não há um consenso na literatura atual.

A nicotina presente na fumaça de cigarro pode induzir alterações em suas propriedades metabólicas, especialmente no metabolismo oxidativo, reduzindo as fibras tipo I e aumentando o tipo IIb¹².

Neste trabalho não foram observadas diferenças significantes para as fibras tipo I e II do músculo gastrocnêmio entre os grupos analisados. Tal achado corrobora com Nakatani et al.²³, que ao analisarem o músculo EDL de ratos, não observaram diferença na distribuição do tipo de fibra, independente da dosagem de fumaça de cigarro ou região muscular. Entretanto em outro estudo, constataram menor percentual de fibras tipo I e maior de fibras tipo II no músculo sóleo de ratos hipertensos espontâneos com dosagem elevada de fumaça de cigarro²⁵.

Ademais, encontra-se como limitação deste estudo não ter avaliado o peso corporal das ratas durante todo o período compreendido entre prenhez e lactação, pois a partir destes dados poderíamos inferir a proporção de sobrecarga imposta pela prenhez. E como perspectiva futura, o presente estudo levanta a possibilidade da análise imunohistoquímica para contagem de células inflamatórias.

Em síntese, este estudo mostrou que o exercício físico intensificou as alterações morfológicas e histoquímicas causadas pelo tabagismo passivo no músculo esquelético de ratas durante a prenhez e lactação, entretanto não influenciou a medida de menor diâmetro das fibras musculares, e nem os tipos de fibras, assim como o tabagismo passivo.

Agradecimentos

Agradecemos ao técnico do Laboratório de Histologia da FCT/UNESP, Sidney Siqueira Leirião pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

Referências

1. Rogers JM. Tobacco and pregnancy. *Reproductive Toxicology*. 2009; 28:152-160.
2. Brownson RC, Figgs LW, Caisley LE. Epidemiology of environmental Tobacco smoke exposure. *Oncogene*. 2002; 21:7341-7348.
3. Coleman T. Reducing Harm From Tobacco Smoke Exposure During Pregnancy. *Birth Defects Research*. 2008; 84:73-79.
4. Mello PR, Pinto GR, Botelho C. The influence of smoking on fertility, pregnancy and lactation. *J Pediatr*. 2001; 77:257-264.
5. Mello PRB, Okay TS, Botelho C. Influência da exposição à fumaça lateral do cigarro sobre o ganho de peso e o consumo alimentar de ratas gestantes: análise do peso e do comprimento dos filhotes ao nascimento. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2006; 28(3):143-150.
6. Mello PRB, Okay TS, Botelho C. The effects of exposing rats to cigarette smoke on milk production and growth of offspring *Jornal de Pediatria*. 2007; 83(3):267-273.
7. Cavalcante SR, Cecatti JG, Pereira RI, Baciuk EP, Bernardo AL, Silveira C. Water aerobics II: maternal body composition and perinatal outcomes after a program for low risk pregnant women. *Reproductive Health*. 2009; 6(1):1-7.
8. Melzer K, Schutz Y, Boulvain M, Kayser B. Physical activity and pregnancy: cardiovascular adaptations, recommendations and pregnancy outcomes. *Sports Med*. 2010; 40(6):493-507.

9. Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. 2002; 81(11):S40-S51.
10. Chattopadhyay K, Chattopadhyay BD. Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein. *Indian J Med Res*. 2008; 127:571-576.
11. Montes de Oca M, Loeb E, Torres SH, De Sanctis J, Hernández N, Tálamo C. Peripheral muscle alterations in non-COPD smokers. *Chest*. 2008; 131(1):13-18.
12. Larson L, Orlander J, Ansved T, Edstron L. Effects of chronic nicotine exposure on contractile enzyme-histochemical and biochemical properties of fast- and slow-twitch skeletal muscles in the rat. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1998; 134(4):519-527.
13. Czekaj P, Pałasz A, Lebda-Wyborny T, Nowaczyk-Dura G, Karczewska W, Florek E, et al. Morphological changes in lungs, placenta, liver and kidneys of pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Int Arch Occup Environ Health*. 2002; 75:S27-S35.
14. Edirisinghe I, Yang S, Yao H, Rajendrasozhan S, Caito S, Adenuga D, et al. VEGFR-2 inhibition augments cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction. *The FASEB Journal*. 2008; 22:297-310.
15. Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi-Filho G, Dohlnikoff M, Pereira PM, Conceição GMS, et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1997; 30:1241-1247.
16. Volpato GT, Damasceno DC, Campos KE, Rocha R, Rudge MVC, Calderon IMP. Avaliação do efeito do exercício físico no metabolismo de ratas diabéticas prenhes. *Rev Bras Med Esporte*. 2006; 12(5):229-233.

17. Minamoto VB, Grazziano CR, Salvini TF. Effect of single and periodic contusion on the rat soleus muscle at different stages of regeneration. *Anatomical Record*, 1999; 254:281-287.
18. Salvini TF, Morini CC, Selistre de Araújo HS & Ownby CH. Long-term regeneration of fast and slow murine skeletal muscles after induced injury by ACL myotoxin isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) venom. *Anatomical Record*. 1999; 254:521-533.
19. Bonfim MR, Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Padulla SAT, Accioly MF, Souza RSD, Azoubel R. Muscle response to the association of statin and physical exercise in rats. *Int. J. Morphol.* 2009; 27(4):1155-1161.
20. Dubowitz V, Sewry CA. *Muscle biopsy: a practical approach*. 3rd Ed. China: Saunders Elsevier; 2007.
21. Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos GER. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem Cell Biol.* 1999; 111:117–123.
22. Perkins KA, Sexton JE, Dimarco A, Fonte C. Acute effects of tobacco smoking on hunger and eating in male and female smokers. *Appetite*. 1994; 22:149-158.
23. Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Ishihara A. Effects of exposure to cigarette smoke at different dose levels on extensor digitorum longus muscle fibres in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30(9):671-677.
24. De Paepe B, Brusselle GG, Mães T, Creus KK, D'Hose S, D'Haese N, Bracke KR, D'Hulst AI, Joos GF, De Bleecker JL. TNF_α receptor genotype influences smoking-induced muscle-fiber-type shift and atrophy in mice. *Acta Neuropathol.* 2008; 115:675–681.

25. Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Ishihara A. Responses of exposure to cigarette smoke at three dosage levels on soleus muscle fibers in Wistar- Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 2002; 90(2):157-163.
26. Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Camargo RCT, Francischeti FA, Belangero WD, Dal Pai V. Efeitos do esteróide anabólico nandrolona sobre o músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico através de natação: estudo histológico, histoquímico e morfométrico. *Rev Bras Med Esporte* 2006; 12(5):243-248.
27. Hawke TJ. Muscle stem cells and exercise training. *Exercise and Sports Science Reviews* 2005; 33:63-8.
28. Morse CI, Pritchard LJ, Wüst RCI, Jones DA, Degens H. Carbon monoxide inhalation reduces skeletal muscle fatigue resistance. *Acta Physiol* 2008; 192:397-401.
29. Wüst RCI, Morse CI, Haan A, Rittweger J, Jones DA, Degens H. Skeletal muscle properties and fatigue resistance in relation to smoking history. *Eur J Appl Physiol* 2008; 104:103-110.

TABELA 1

Tabela 1. Média seguida do desvio padrão do peso muscular (g), corporal (g) inicial e final das ratas.

GRUPOS	PESO INICIAL	PESO FINAL	SÓLEO	GASTROCNÊMIO
GF	229,5 ± 14,0	261,1 ± 38,2	0,127 ± 0,015	1,479 ± 0,120
GC	236,2 ± 12,7*	285,7 ± 30,3	0,129 ± 0,009	1,392 ± 0,094
GFN	227,2 ± 18,8*	281,4 ± 20,5	0,125 ± 0,012	1,398 ± 0,130
GN	231,3 ± 8,2*	275,0 ± 34,0	0,125 ± 0,007	1,355 ± 0,120

GF: exposto à fumaça de cigarro, GC: controle, GFN: exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação, e GN: submetido ao programa de natação. * Diferença significante entre peso inicial e peso final. Considere: $p < 0,05$.

TABELA 2

Tabela 2. Análise de frequência (%) da ocorrência das características morfológicas das fibras dos músculos sóleo e gastrocnêmio das ratas de cada grupo.

Características	Sóleo				Gastrocnêmio			
	GF	GC	GFN	GN	GF	GC	GFN	GN
Endomísio aumentado	50	---	100	80	50	33	83	80
Perimísio aumentado	67	50	100	100	83	33	83	80
Fibras Polimórficas	100	83	100	100	100	100	100	100
Fibras Angulares	100	83	100	100	100	100	100	100
Fibras Arredondadas	100	50	100	60	83	33	100	100
Fibras Atróficas	100	17	100	80	100	33	100	60
Fibras Hipertróficas	50	---	67	100	17	---	50	100
Fibras Fagocitadas	83	17	100	100	100	33	100	60
Fibras Necrosadas	50	---	100	20	33	---	17	---
Enrodilhamento	17	---	---	---	---	---	---	---
Núcleo Central	33	---	67	20	33	---	67	20
Splittings	100	---	100	40	67	---	83	20
Infiltrado Inflamatório	100	33	100	80	100	67	100	80
Lesão sarcolemal	100	33	100	100	100	67	100	80

GF: exposto à fumaça de cigarro, GC: controle, GFN: exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação, e GN: submetido ao programa de natação.

FIGURA 1

Figura 1. Secção transversal da região média do músculo sóleo (A- D) e do músculo gastrocnêmio (E – H) de ratas. HE 500 X. A e E) Grupo exposto à fumaça de cigarro. B e F) Grupo controle. C e G) Grupo exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação. D e H) Grupo submetido ao programa de natação. TR = Fibra Triangular, AT = Fibra Atrófica, AR = Fibra Arredondada, PM = Fibra Polimórfica, FG = Fagocitose, INF = Infiltrado Inflamatório, NC = Necrose, SP = Splitting, ED = Endomísio aumentado e PE = Perimísio aumentado.

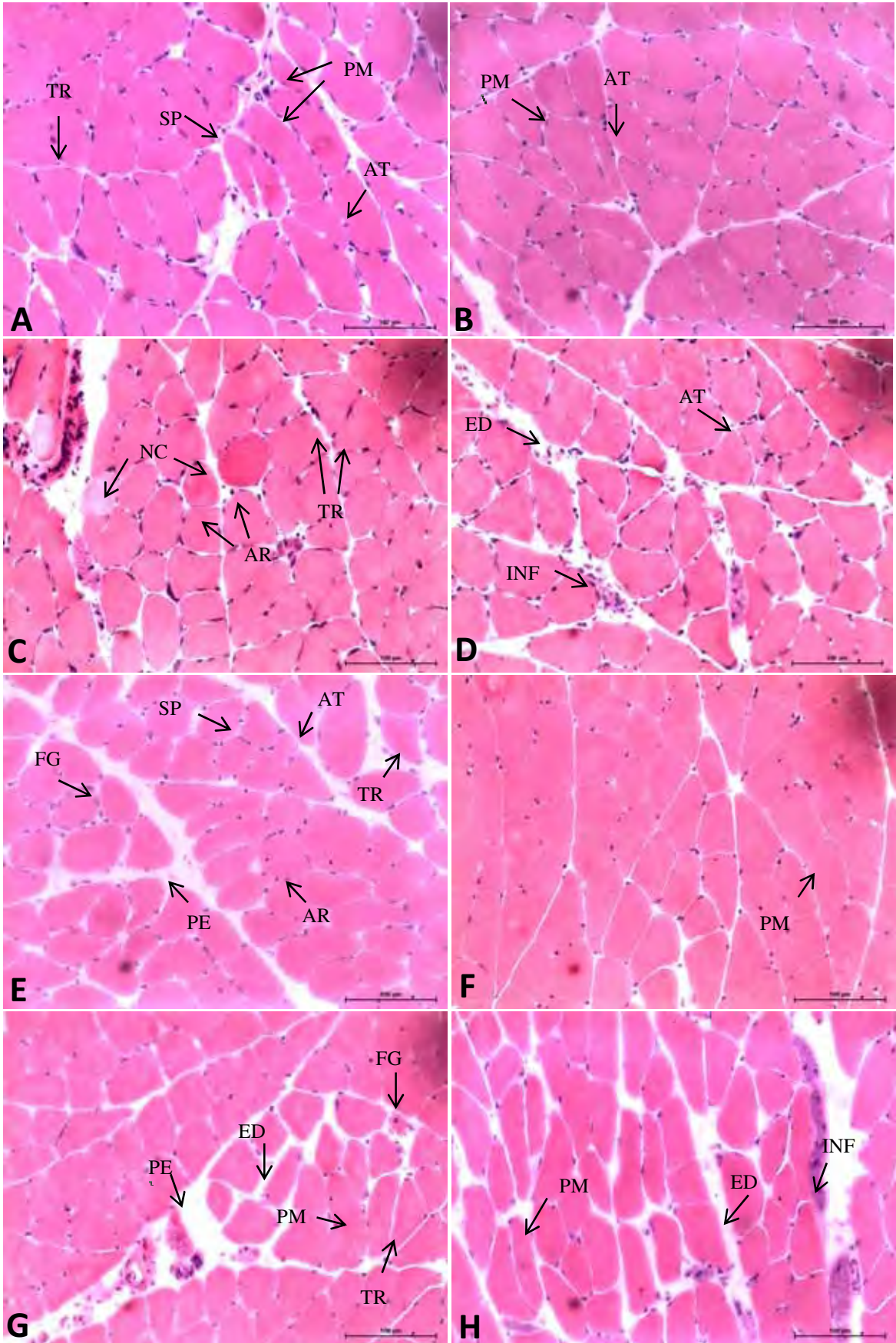


FIGURA 2

Figura 2. Secção transversal da região média do músculo sóleo (A- D) e do músculo gastrocnêmio (E – H) de ratas. NADH-TR 500 X. A e E) Grupo exposto à fumaça de cigarro. B e F) Grupo controle. C e G) Grupo exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação. D e H) Grupo submetido ao programa de natação.

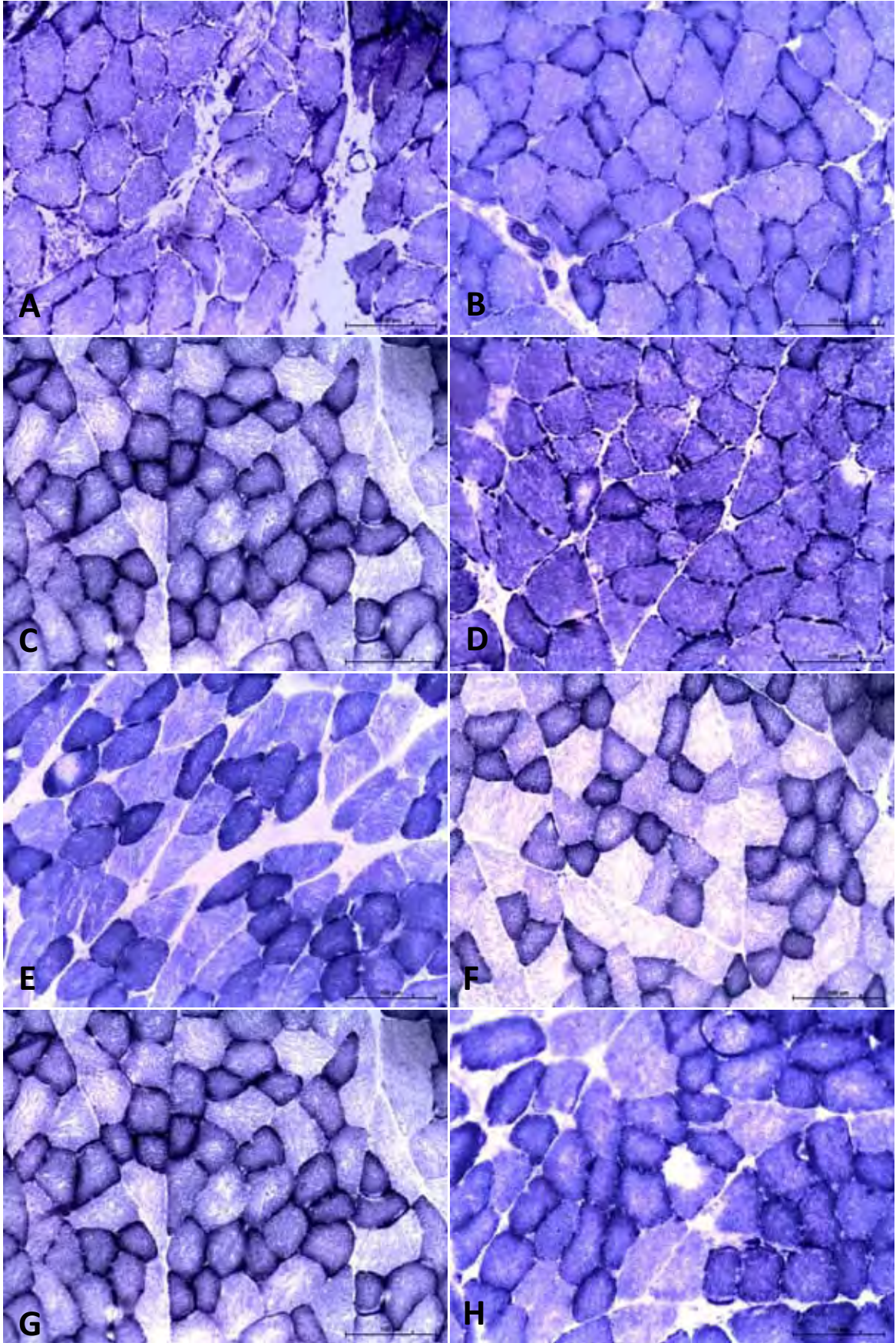


TABELA 3

Tabela 3. Média seguida do desvio padrão do menor diâmetro (μm) das fibras dos músculos sóleo e gastrocnêmio das ratas.

Grupos	Sóleo	Gastrocnêmio	
		Tipo I	Tipo II
GF	41,80 \pm 3,48	34,37 \pm 2,30	39,89 \pm 3,72
GC	44,34 \pm 3,44	33,48 \pm 2,56	40,15 \pm 3,13
GFN	40,91 \pm 2,37	32,14 \pm 5,00	38,81 \pm 6,75
GN	44,02 \pm 3,84	34,15 \pm 2,58	42,52 \pm 3,41

GF = exposto à fumaça de cigarro, GC = controle, GFN = exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação, e GN = submetido ao programa de natação. Considere: $p < 0,05$.

TABELA 4**Tabela 4.** Frequência (%) dos tipos de fibra do músculo gastrocnêmio das ratas.

Grupos	Gastrocnêmio	
	Tipo I (%)	Tipo II (%)
GF	37,37	62,63
GC	37,32	62,68
GFN	29,90	70,01
GN	37,88	62,12

GF = exposto à fumaça de cigarro, GC = controle, GFN = exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação, e GN = submetido ao programa de natação. Considere: $p < 0,05$.

Artigo II

**INFLUÊNCIA DO TABAGISMO PASSIVO ASSOCIADO AO EXERCÍCIO FÍSICO
REALIZADO POR RATAS DURANTE PREENHEZ E LACTAÇÃO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE SEUS FILHOTES.**

Título Resumido: Tabagismo passivo durante prenhez e lactação

*Bruna C.G. Valsoni¹, Mariana R. Bonfim¹, Fábio Y. Kodama¹, Jacqueline B. Urban¹, Regina
C.T. Camargo¹, Luiz Carlos M. Vanderlei¹, José Carlos S. Camargo Filho^{1*}*

¹ Departamento de Fisioterapia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (FCT/UNESP), Presidente Prudente, SP, Brasil.

*** Endereço para Correspondência:**

José Carlos S. Camargo Filho

Departamento de Fisioterapia, FCT / UNESP

Rua Roberto Simonsen, 305, 19060-900 Presidente Prudente, SP, Brasil.

Fax: (18) 3229-5353

E-mail: camargo@fct.unesp.br

Apoio financeiro: CAPES

Categoria do estudo: Ciência básica

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar mortalidade, peso e comprimento corporal, e o músculo gastrocnêmio dos filhotes de ratas prenhes submetidas ao programa de natação associado ao tabagismo passivo. 24 ratas foram divididas em quatro grupos: GF (exposto à fumaça de cigarro), GC (controle), GFN (submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro) e GN (submetido ao programa de natação). A mortalidade e a aferição do peso e comprimento dos filhotes foram realizadas em quatro momentos. O músculo gastrocnêmio dos filhotes foi obtido para avaliação do desenvolvimento muscular. A média do nascimento de filhotes foi menor para os grupos GF e GFN e maior para o GN. No nascimento, somente o GFN apresentou medidas de peso e comprimento significativamente inferiores ao controle, já na lactação foram os grupos expostos à fumaça de cigarro. Os grupos GF e GFN apresentaram retardo no desenvolvimento muscular. Concluindo, o tabagismo passivo durante a prenhez e lactação exerceu influência negativa sobre o número, peso e comprimento corporal dos filhotes do nascimento ao desmame e sobre o desenvolvimento muscular; o programa de natação influenciou positivamente tais variáveis no momento do nascimento, entretanto, não possibilitou os mesmos benefícios durante a lactação; e a associação destes influenciou negativamente tais medidas.

Introdução

No mundo mais de um bilhão de pessoas são fumantes, sendo o tabagismo a principal causa de morte evitável, além de ser responsável por 90% dos tumores pulmonares, 75% das bronquites crônicas e 25% das doenças isquêmicas do coração¹. No Brasil, em torno de um terço da população adulta tem o vício de fumar, sendo aproximadamente 11,2 milhões de mulheres, em sua maioria na idade reprodutiva, entre 20 e 49 anos². Este fato se faz preocupante, pois o tabagismo interfere na função reprodutora das mulheres no período pré-concepção³, na evolução da gravidez⁴ e na lactação⁵.

O tabagismo materno provoca déficit do crescimento do feto, levando ao maior risco de prematuridade, aborto espontâneo e baixo peso ao nascer⁶, sendo que este risco é aumentado proporcionalmente ao número de cigarros fumados, principalmente no terceiro trimestre gestacional⁷. Sabendo disso, a gestante tende a interromper o hábito de fumar, a diminuir o número de cigarros fumados, ou a parar de fumar definitivamente. Entretanto, muitas gestantes ainda continuam fumando durante toda a gravidez e o período de amamentação⁸.

Também deve ser considerado, que várias mulheres mesmo parando de fumar no período gestacional, continuam frequentando ambientes fechados poluídos por fumaça de cigarro, como ambientes de trabalho, lazer, escolas e demais espaços públicos fechados⁹. Já outras gestantes são expostas à fumaça de cigarro em seu próprio domicílio por conviver com o companheiro que possui o hábito de fumar, dessa maneira, a gestante passa a ser fumante passiva por inalar a fumaça lateral¹⁰.

Por outro lado, gestantes buscam no exercício físico um estilo de vida mais saudável, com o intuito de promover o controle de ganho de peso, uma vez que em excesso torna-se um fator de risco importante na gravidez, levando ao desenvolvimento de patologias como hipertensão arterial, diabetes, obesidade pós-parto, entre outras¹¹.

Além dos benefícios que o exercício físico promove para a gestante, encontramos os relacionados com o maior peso fetal e do recém-nascido¹², bem como com o menor risco de aborto, menor índice de parto prematuro¹³ e de cesarianas¹⁴.

Entretanto, vários aspectos devem ser levados em consideração quando se trata da prescrição de exercício físico para gestante, como intensidade, duração, frequência, fase gestacional e local para sua realização¹⁵, podendo ser em solo ou água. O exercício praticado em água tem algumas vantagens, pois previne traumas e lesões musculoesqueléticas, assim como melhora a circulação periférica¹⁶.

Partindo do pressuposto de que o exercício físico durante a gestação e amamentação promove benefícios tanto para a mãe quanto para o feto e recém-nascido, e de que em contrapartida o tabagismo passivo provoca danos para ambos, conforme verificado em publicações de estudos experimentais e com humanos, pretende-se verificar os efeitos da associação entre tabagismo passivo e exercício físico, pois não se encontra relatos dos benefícios ou malefícios desta associação para o desenvolvimento do feto e recém-nascido.

Nesse sentido, o modelo experimental do nosso estudo teve por objetivo avaliar a influência do tabagismo passivo associado ao exercício físico, por meio de um programa de lactação, realizado por ratas durante a prenhez e lactação, sobre o peso e o comprimento de seus filhotes ao nascer e no desenvolvimento pós-parto até o desmame, bem como sobre a musculatura esquelética e o número de filhotes por rata.

Métodos

Este estudo utilizou o procedimento técnico experimental aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP – Campus de Presidente Prudente, sob o Processo nº 24/2009, sendo seguidos os “Princípios Éticos na Experimentação

Animal” adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Animais e desenho experimental

Para tal, foram utilizadas 24 ratas virgens em idade reprodutiva (90 dias) e oito ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albina, Rodentia, Mammalia), mantidos em gaiolas individuais, sob temperatura média de 22 ± 2 °C, umidade de $50 \pm 10\%$, ciclo claro/escuro de 12 horas (7-19h) e tiveram livre acesso à água e ração padrão da marca Primor[®].

Com o objetivo de homogeneizar os grupos as 24 ratas virgens foram submetidas a um esfregaço vaginal para verificação da fase do ciclo estral e em seguida alocadas por proximidade das fases em quatro grupos com seis animais cada, sendo: GF (expostos a fumaça de cigarro), GC (controle), GFN (submetido ao programa de natação e expostos a fumaça de cigarro) e GN (submetido ao programa de natação).

A verificação do ciclo estral foi realizada por mais uma semana após a divisão dos grupos e ao detectar o início da fase fértil (estro), as ratas foram colocadas em gaiolas individuais com um rato macho, onde permaneceram por uma noite para a cópula. Na manhã seguinte, a prenhez foi diagnosticada pela presença de espermatozóide no esfregaço vaginal, o que caracterizou o dia zero da prenhez¹⁷.

Protocolo de exposição à fumaça de cigarro

No primeiro dia da prenhez foi iniciado o protocolo de exposição à fumaça de cigarro, o qual foi dividido em duas fases: primeira, fase de adaptação, compreendida pelos cinco primeiros dias, onde os animais dos grupos GF e GFN foram expostos à fumaça de cigarro na câmara de fumo a uma temperatura de 23 ± 1 °C¹⁸, durante 10 minutos, uma vez ao dia, com 250 ppm (partes por milhão) de CO (monóxido de carbono) medido pelo detector de gás específico TxiPro[®] da Biosystems. A segunda fase ou fase experimental, passou a durar 30

minutos, duas vezes ao dia (manhã e tarde), seis dias por semana, com 350 ppm de CO por exposição¹⁹.

Os animais dos grupos GC e GN foram submetidos à inalação de ar comprimido, com as mesmas características de tempo e periodicidade dos animais expostos ao fumo.

Para a realização deste protocolo foram utilizadas duas câmaras hermeticamente fechadas, uma para os grupos GF e GFN com inalação de fumaça de cigarro e a segunda para os animais dos grupos GC e GN com inalação somente de ar comprimido. A câmara para inalação de fumaça era dividida em dois compartimentos, um para a colocação de cigarros acesos, e outro destinado à exposição da gaiola com seis animais, sendo adaptada segundo o modelo de inalação descrito por Cendon Filha²⁰.

Foram utilizados cigarros, adquiridos comercialmente, compostos por: mistura de fumos, açúcares, papel de cigarro, extratos vegetais e agentes de sabor, que produziram em cada queima: 10mg de alcatrão, 0,9mg de nicotina e 10mg de monóxido de carbono, conforme relatado na embalagem do produto.

Protocolo do programa de natação

No primeiro dia da prenhez foi iniciado o programa de natação, como descrito por Volpato et al.²¹, em um tanque contendo água a 30°C, no nível de 40 cm com o intuito de não permitir o apoio da calda das ratas no fundo do tanque, tendo assim o estímulo para nadar.

Este programa foi dividido em duas fases: a primeira, fase de adaptação ao treinamento, caracterizada pelas cinco primeiras sessões de natação com aumento progressivo de 10 minutos de duração por dia, começando com 20 minutos e chegando à quinta sessão com 60 minutos. A segunda, fase de treinamento, foi iniciada na sexta sessão mantendo-se o tempo de duração de 60 minutos até a 36ª sessão. As sessões de natação foram diárias, sem interrupção, no período da manhã, por seis dias da semana durante seis semanas, e no caso dos grupos GFN após a exposição à fumaça de cigarro.

Os animais dos grupos GF e GC foram submetidos às mesmas condições do programa de natação, entretanto com água a 10 cm por 15 minutos, para que sofressem o mesmo estresse do meio, entretanto evitando o treinamento físico por meio da natação.

Tanto o protocolo de exposição à fumaça de cigarro, quanto o programa de natação terminaram no 21º de lactação, perfazendo 36 dias de intervenção dos 42 dias compreendidos entre início da prenhez e fim da lactação, pois houve descanso aos domingos.

Dados coletados

As ratas foram pesadas antes da cópula e após 21 dias de lactação. Também foi registrado o número de filhotes nascidos vivos ou mortos, bem como o peso e o comprimento dos recém-nascidos em quatro momentos: até 24 horas após o parto (M0), com sete dias (M1), com 14 dias (M2) e no desmame com 21 dias (M3). Para pesagem dos animais, foi utilizada a balança eletrônica com variação de 0,1 g, e para aferir o comprimento dos filhotes, foi considerado o corpo e a cauda dos mesmos, utilizando-se uma régua sobre uma superfície plana.

No 21º dia de lactação todos os filhotes foram eutanasiados mediante decapitação por guilhotina. Após o respectivo sacrifício, foi iniciado o procedimento cirúrgico para a retirada do músculo gastrocnêmio do membro pélvico esquerdo, que em seguida era pesado.

Os músculos foram congelados pelo método de congelamento de tecido não fixado e armazenados em botijão de nitrogênio a -180°C. Posteriormente, foram confeccionadas lâminas com cortes transversais de 6µm a -20°C coradas pelo método Hematoxilina e Eosina (HE).

Para a verificação das possíveis variações do tamanho das fibras do músculo gastrocnêmio foi utilizado um sistema de análise por imagem computadorizada (NIS-Elements D3.0 - SP7 - Nikon®), onde em cada imagem com aumento 100x foram efetuadas

as mensurações do menor diâmetro em 120 fibras musculares (μm), adaptado segundo Dubowitz & Brooke²².

Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o software SPSS Statistics 17.0 onde foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação de sua normalidade. Utilizou-se o método estatístico descritivo com apresentação dos valores de médias seguidos de seus respectivos desvios padrões, e intervalo de confiança (95%). Para verificação de diferenças das variáveis entre os grupos estudados, foi utilizada a análise de variância (ANOVA - One Way) e pós-teste de Tukey. Na correlação não paramétrica foi aplicado o teste de Spearman para verificar o coeficiente de correlação do número de filhotes por rata com a média do peso e do comprimento corporal destes filhotes. O teste T-pareado foi utilizado para comparação dos valores de peso inicial e final das ratas. A análise de variância para medidas repetidas foi aplicada para avaliar a média do peso e do comprimento dos filhotes em relação aos momentos em cada grupo. Para todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

Peso corporal das ratas

A comparação do peso das ratas virgens antes da cópula mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos estudados ($p = 0,734$). Ao final do período de lactação, as ratas foram novamente pesadas e também não houve diferença significativa entre os grupos controle e experimentais ($p = 0,580$), conforme tabela 1. Na comparação dos valores de peso inicial e final, foi verificada diferença significativa para os grupos GC ($p = 0,002$), GFN ($p = 0,001$) e GN ($p = 0,040$), somente o GF não apresentou diferença significativa ($p = 0,108$).

INSERIR TABELA 1

Número de filhotes

No momento do nascimento (M0), o grupo apenas submetido ao programa de natação (GN) apresentou o maior número de filhotes e o grupo somente exposto à fumaça de cigarro (GF) o menor número. Após sete dias de lactação (M1) houve um número de mortes reduzido nos grupos GF e GFN, e pode-se observar um maior número de mortes para o GN. Na segunda semana de lactação (M2) o GN continuou apresentando maior mortalidade, seguido do grupo controle que mostrou apenas algumas mortes. Já na semana que antecedeu o desmame (M3) não houve morte de filhotes, como pode ser observado na figura 1. A partir da média do nascimento de filhotes das ratas dos diferentes grupos do presente estudo, foi verificada uma diminuição do número de filhotes do nascimento até o desmame, sendo observada uma maior porcentagem de mortes no GN no decorrer do tempo.

INSERIR FIGURA 1

Peso corporal dos filhotes

Com relação à evolução do peso corporal dos filhotes em cada grupo, observa-se a partir dos valores médios do peso corporal dos filhotes de cada rata, que houve ganho de peso significativo ao longo do tempo para todos os grupos. Na comparação dos grupos estudados nos diferentes momentos (M0, M1, M2, M3) verificou-se que no nascimento (M0) o peso do grupo controle (GC) foi significativamente maior em relação ao grupo exposto à fumaça de cigarro e submetido ao protocolo de natação (GFN) ($p = 0,016$). Nos primeiros sete dias de lactação (M1) verificou-se diferença estatística entre os grupos GF e GC ($p = 0,08$); e GC e GFN ($p = 0,005$), sendo o peso corporal do GC superior aos demais grupos. Na segunda semana de lactação (M2) observou-se que os filhotes do grupo controle obtiveram peso corporal superior aos outros grupos, sendo a diferença significativa entre o GF ($p = 0,003$), GFN ($p = 0,003$) e GN ($p = 0,023$). Na última semana de lactação (M3) mais uma vez o GC apresentou medidas de peso maiores que o GF ($p = 0,032$) e que o GFN ($p = 0,007$).

No GF os deltas 1 (diferença entre M0 e M1) e 2 (diferença entre M1 e M2) mostraram-se positivos e semelhantes, além do delta 3 (diferença entre M2 e M3) superior aos demais deltas. No GC verificou-se deltas positivos superiores a todos os outros grupos e semelhantes nos primeiros momentos, sendo o delta 3 maior em relação aos demais. Os deltas do GFN também foram positivos com pouca variação, entretanto o delta entre M2 e M3 apresentou menor aumento. No GN observamos os deltas 1 e 2 iguais e positivos, com o delta 3 bem superior aos demais.

Pelo Índice de Correlação de Spearman, observou-se que não houve correlação positiva, nem negativa entre o peso corporal e o número de filhotes para os grupos GF, GFN e GN nos diferentes momentos, apenas o GC apresentou correlação negativa no M3.

INSERIR FIGURA 2 E TABELA 2

Comprimento corporal dos filhotes

A evolução do comprimento corporal dos filhotes foi significativa em relação aos momentos para todos os grupos. Quanto à diferença entre os grupos em cada momento observou-se que, no nascimento somente o GFN apresentou medidas significativamente inferiores ao grupo controle ($p = 0,026$) e no M1 mais uma vez o GFN mostra-se inferior ao GC ($p = 0,017$). Na segunda semana de lactação todos os grupos apresentaram diferença significativa em relação ao GC, tendo o GF ($p = 0,000$), o GFN ($p = 0,004$) e o GN ($p = 0,027$) medidas de comprimento corporal dos filhotes menores. No M3 os grupos expostos à fumaça de cigarro, GF ($p = 0,003$) e GFN ($p = 0,001$), apresentaram médias de comprimentos inferiores ao grupo controle (Figura 2).

Com relação ao delta dos comprimentos nos diferentes momentos, verificou-se no GF variação positiva em todos os deltas, apresentando o delta 2 o menor aumento. Os deltas do GC mostraram-se positivos e superiores aos demais grupos, com deltas 1 e 2 iguais. O GFN

também apresentou deltas 1 e 2 iguais e positivos, além de delta 3 menor em relação aos demais. Foi observado no GN deltas positivos, sendo o delta 2 inferior ao delta 1 e o delta 3 superior aos demais.

Não se verificou correlação positiva ou negativa entre o comprimento corporal e o número de filhotes pelo Índice de Correlação de Spearman nos diferentes momentos para os grupos estudados.

INSERIR TABELA 3

Peso muscular dos filhotes

A análise da comparação do peso do músculo gastrocnêmio dos filhotes entre os diferentes grupos estudados indicou que apenas não houve diferença significativa entre GF e GFN ($p > 0,05$), conforme Tabela 4.

INSERIR TABELA 4

Morfometria muscular

A análise de variância mostrou que apenas houve diferença estatística nos valores de menor diâmetro das fibras do músculo gastrocnêmio entre os grupos GC e GFN ($p = 0,039$), como observado na Tabela 4.

Discussão

No presente estudo foi testada a hipótese de que o exercício, por proporcionar inúmeros benefícios durante o período gestacional e de amamentação, teria uma influência positiva no desenvolvimento dos filhotes de ratas quando associado ao tabagismo passivo. Para aumentar o entendimento sobre o tabagismo passivo, atualmente, modelos animais têm sido utilizados principalmente em estudos com relação ao feto²³. Partindo deste princípio, o modelo utilizado neste experimento de exposição à fumaça de cigarro baseou-se em estudos

prévios^{18,19,20}, com o intuito de reproduzir o tabagismo passivo durante a prenhez e lactação de ratas.

O resultado de peso corporal das ratas revelou que houve aumento do período anterior à cópula para o vigésimo primeiro dia de lactação, entretanto no GF não foi significativa a diferença entre o peso inicial e final, podendo ser justificada pelo efeito inibidor de apetite provocado pela nicotina, contida no cigarro²⁴. Já o mesmo não foi verificado no GFN, possivelmente pelos efeitos do exercício. Por outro lado, não houve diferença entre os grupos no peso inicial, demonstrando homogeneidade dos grupos antes do início dos protocolos. Nossos achados corroboram com os de Mello et al.¹⁷, ao verificarem a influência da exposição à fumaça lateral do cigarro sobre o ganho de peso de ratas gestantes, concluíram que a exposição ao tabaco reduziu o ganho de peso delas, sendo que parte desse efeito foi devido ao estresse da manipulação.

Em relação ao número de filhotes por rata, o resultado obtido mostrou que no nascimento a média dos filhotes das ratas submetidas somente ao programa de natação foi superior a todos os grupos estudados. Uma das hipóteses para tal acontecimento seria o risco de aborto espontâneo reduzido, como um benefício do exercício físico ao melhorar a oxigenação tecidual da mãe e conseqüentemente do feto. Ainda, com relação ao GN, foi observada maior mortalidade com o passar do tempo, podendo ser justificada pelo maior gasto energético da mãe durante a lactação²⁵.

Em contrapartida, os grupos expostos à fumaça de cigarro apresentaram as menores médias de número de filhotes ao nascimento, onde supõe-se uma interferência do tabagismo passivo na prenhez, podendo estar associado à ocorrência de aborto espontâneo, mortes perinatais, malformações congênitas. De fato, o parto prematuro e o aborto espontâneo têm sido verificados em estudos com humanos, onde a gestante é tabagista^{26,27}. Neste caso, a possibilidade do aborto e de natimortos poderia ter sido verificada pela quantidade de animais

encontrados mortos, porém pelo fato da própria mãe eliminar os filhotes mortos ou com alterações congênitas, enfrentamos limitação na maior exploração deste tópico. Além disso, foi verificada pouca alteração no número de filhotes durante a lactação nesses grupos, pois ocorreu um número reduzido de mortes.

O maior número de filhotes por rata observado no GN pode não ter sido um fator influenciador das mortes dos filhotes, visto que pela correlação de Spearman não houve correlação significativa do número de filhotes com o peso e o comprimento dos mesmos nos quatro momentos. Apenas o grupo controle apresentou correlação negativa significativa no último momento, o que nos leva a supor influência das intervenções nos momentos anteriores sobre o peso e o comprimento dos filhotes.

No nascimento o grupo exposto à fumaça de cigarro e submetido ao exercício físico mostrou valores de peso e comprimento significativamente menores em relação ao controle. De maneira semelhante com relação ao tabagismo passivo, Mello et. al.¹⁷ verificaram ao nascimento redução do peso e do comprimento de filhotes de ratas expostas à fumaça de dois cigarros/animal/dia. Além disso, no estudo de Ward et. al.²⁸ com mais de 18 mil crianças do Reino Unido, averiguaram menores pesos ao nascimento de filhos cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro em domicílio durante a gestação.

A possível hipótese para os menores valores de peso e de comprimento dos animais expostos à fumaça de cigarro e submetidos ao exercício físico ao nascimento se refere, primeiramente, aos efeitos da nicotina contida na fumaça de cigarro, pois esta libera catecolaminas na circulação materna, levando à má nutrição e hipóxia fetal crônica, por reduzir o fluxo sanguíneo placentário²⁹. Além disso, durante o período gestacional eventos estressores resultam na diminuição do tamanho dos filhotes³⁰, levando a inferir que o estresse sofrido pela rata prenhe durante o exercício físico foi somatizado com a exposição à fumaça

de cigarro, pois o grupo apenas exercitado (GN) não apresentou peso e comprimento significativamente inferiores.

Nos momentos seguintes, correspondentes à lactação, houve o aumento do peso e do comprimento dos filhotes de todos os grupos, entretanto os grupos expostos à fumaça de cigarro apresentaram medidas inferiores às do grupo controle. Tal fato pode ser explicado pela concentração de nicotina contida no leite materno⁵, pois esta interfere no acúmulo de lipídios durante a gestação, o que pode reduzir a capacidade da rata em alimentar seus filhotes, visto o gasto energético despendido durante a lactação²⁵. Outra hipótese a ser levantada está relacionada com a ação que a nicotina possui de diminuir a concentração do hormônio prolactina do sangue materno, responsável pela produção do leite, quando a exposição à fumaça de cigarro passa a ser crônica⁵.

Além disso, sabe-se que o filhote nasce praticamente imóvel, com deficiência auditiva e visual e sem pêlos, necessitando dos cuidados da mãe, que os busca quando se afastam durante as primeiras semanas de lactação³¹. Dessa forma, pode-se inferir que o estresse sofrido pelas mães durante o período de lactação influenciou em seu comportamento maternal, pois a mãe estressada não tende a buscar seu filhote para amamentar e conseqüentemente verifica-se retardo no desenvolvimento destes pela má nutrição.

No grupo exercitado (GN), apenas na segunda semana de lactação as medidas de peso e comprimento foram significativamente inferiores às do grupo controle, sugerindo que com o passar do tempo as mães dispõem um gasto energético maior para suprir a lactação, o que acaba por influenciar o retardo no ganho de peso e comprimento dos filhotes²⁵. Entretanto, na última semana (M3) o quadro se alterou pelo fato dos filhotes se apresentarem mais independentes e começarem a ingerir alimentos sólidos³².

Com relação à evolução de peso e comprimento entre os momentos, observou-se pouca variação entre os deltas 1 e 2 em todos os grupos, sendo neste período os filhotes

totalmente dependentes da mãe para a nutrição por apresentarem pouca mobilidade³¹, por esse motivo a variação está relacionada ao estresse sofrido por ela.

No delta 3, correspondente a diferença entre M2 e M3, verificou-se um maior aumento tanto de peso como de comprimento para os grupos GF, GC e GN, entretanto o GFN manteve praticamente a mesma variação dos deltas 1 e 2. A maior variação para os grupos GF, GC e GN justifica-se pelo fato do filhote, a partir de décimo segundo dia, passar a não depender da busca materna para a lactação, além disso, próximo ao vigésimo dia o filhote passa a alimentar-se de sólidos³².

A hipótese levantada para o GFN não ter apresentado o delta 3 superior como os demais grupos, está relacionada a interação mãe-filhote, pois sabe-se que esta é fundamental para o crescimento e desenvolvimento dos mamíferos³³. O fato da interação mãe-filhote sofrer influência do estresse, fez com que no GFN o desenvolvimento fosse mais lento, visto que as mães foram expostas a dois tipos de estresse.

Quanto ao peso do músculo gastrocnêmio, apenas não foi observada diferença significativa entre os grupos GF e GFN, os quais apresentaram os menores valores. O mesmo foi observado com relação ao peso e comprimento corporal dos filhotes, sugerindo que os efeitos da nicotina contida na fumaça de cigarro também sejam os fatores influenciadores neste caso. Dessa forma, confirma que o peso muscular está diretamente relacionado com o desenvolvimento dos filhotes.

Os resultados da medida do menor diâmetro das fibras do músculo gastrocnêmio puderam revelar o desenvolvimento muscular dos filhotes, e não atrofia ou hipertrofia. Diante disso, observamos que o GFN foi o grupo com pior desenvolvimento, sendo o único a apresentar diferença significativa em relação ao grupo controle. E mais uma vez, verifica-se que a associação de tabagismo passivo com exercício físico, sofrida pela mãe durante a

preñez e lactação, gera somatização de estresses, com conseqüente retardo no desenvolvimento dos filhotes.

Em síntese, observou-se que o tabagismo passivo materno durante preñez e lactação exerceu forte influência negativa sobre o número de filhotes, sobre o peso e comprimento corporal dos mesmos do nascimento ao desmame, bem como sobre seu desenvolvimento muscular. Por outro lado, o exercício por meio do programa de natação influenciou positivamente tais aspectos no momento do nascimento, mas que pelo maior gasto energético requerido não possibilitou os mesmos benefícios durante todo o período de lactação. E por fim, verificou-se que associação do tabagismo passivo com o exercício físico gerou somatização de estresse, que influenciou negativamente as medidas analisadas, e dessa forma, a hipótese levantada neste estudo foi derrubada.

Agradecimentos

Agradecemos ao técnico do Laboratório de Histologia da FCT/UNESP, Sidney Siqueira Leirião pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

Referências

1. Mackay J, Eriksen M 2002 The tobacco atlas. Geneva: World Health Organization.
2. Cabar FR, Carvalho FRC, Carvalho JP 2003 Efeitos do tabagismo na saúde da mulher. *Femina*. 31(4):373-5.
3. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR 1989 Do women with childhood exposure to cigarette smoking have increased fecundability? *Am J Epidemiol* 129:1079-83.
4. Baird DD, Wilcox AJ 1985 Cigarette smoking associated with delayed conception. *JAMA*. 253:2979-83.
5. Horta BL, Victora CG, Menezes AM, Barros FC 1997 Environmental tobacco smoke and breastfeeding duration. *Am J Epidemiol*. 146:128-33.
6. Chiolerio A, Bovet P, Paccaud F 2005 Association between maternal smoking and low birth weight in Switzerland: the EDEN study. *Swiss Med Wkly*. 135(35-36):525-30.
7. Mainous AG, Heuston WT 1994 The effect of smoking cessation during pregnancy on preterm delivery and low birth weight. *J. Fam. Pract.* 38:262-6.
8. DiClemente CC, Dolan-Mullen P, Windsor RA 2000 The process of pregnancy smoking cessation: implications for interventions. *Tobacco Control*. 9 (Suppl III):iii16–iii21.
9. Hackshaw A, Law M, Wald NJ 1997 The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 315: 980-8.
10. Law RL, Hackshaw AK 1996 Environmental tobacco smoke. *Br. Med. Bull*. 52:22-34.
11. Rössner S 1999 Physical activity and prevention and treatment of weight gain associated with pregnancy: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc*. 4 (Suppl): 560-3.
12. Hatch MC, Shu XO, Mclean DE 1993 Maternal exercise during pregnancy, physical fitness, and fetal growth. *Am J Epidemiol*. 137:1105-14.

13. Bishop KR, Dougherty M, Mooney R, Gimotty P, Williams B 1992 Effects of age, parity, and adherence on pelvic muscle response to exercise. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 21:401-6.
14. Bungum TJ, Peaslee DL, Jackson AW, Perez MA 2000 Exercise during pregnancy and type of delivery in nulliparae. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 29: 258-64.
15. ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists). 2002 Committee on Obstetric. Exercise during pregnancy and the postpartum period. Practice n.º 267. *Am Col Obstet Gynecol.* 99:171-3.
16. Katz VL 1996 Water exercise in pregnancy. *Semin Perinatol.* 2:285-91.
17. Mello PRB, Okay TS, Botelho C 2006 Influência da exposição à fumaça lateral do cigarro sobre o ganho de peso e o consumo alimentar de ratas gestantes: análise do peso e do comprimento dos filhotes ao nascimento. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 28(3):143-50.
18. Czekaj P, Pałasz A, Lebda-Wyborny T, Nowaczyk-Dura G, Karczewska W, Florek E, et al. . 2002 Morphological changes in lungs, placenta, liver and kidneys of pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Int Arch Occup Environ Health*75:S27-S35.
19. Edirisinghe I, Yang S, Yao H, Rajendrasozhan S, Caito S, Adenuga D, et al. 2008 VEGFR-2 inhibition augments cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction. *The FASEB Journal.* 22:297-310.
20. Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi-Filho G, Dohlnikoff M, Pereira PM, Conceição GMS, et al. 1997 Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 30:1241-7.

21. Volpato GT, Damasceno DC, Campos KE, Rocha R, Rudge MVC, Calderon IMP 2006 Avaliação do efeito do exercício físico no metabolismo de ratas diabéticas prenhes. *Rev Bras Med Esporte*. 12(5):229-33.
22. Dubowitz V, Sewry CA 2007. *Muscle biopsy: a practical approach*. 3rd Ed. China: Saunders Elsevier.
23. Nelson E, Jodscheit K, Guo Y 1999 Maternal passive smoking during pregnancy and fetal developmental toxicity. Part 1: gross morphological effects. *Hum Exp Toxicol*. 18:252-6
24. Perkins KA, Sexton JE, Dimarco A, Fonte C 1994 Acute effects of tobacco smoking on hunger and eating in male and female smokers. *Appetite*. 22:149-58.
25. Williams CM, Kanagasabai T 1984 Maternal adipose tissue response to nicotine administration in the pregnant rat: effects on fetal body fat and cellularity. *Br J Nutr*. 51:7-13.
26. Meyer MB, Tonascia JA 1977 Maternal smoking, pregnancy complications, and perinatal mortality. *Am J Obstet Gynecol*. 128:494-502.
27. Hadley CB, Main DM, Gabbe SG 1990 Risk factors for preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am J Perinatol*. 7:374-9.
28. Ward C, Lewis S, Coleman T 2007 Prevalence of maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure during pregnancy and impact on birth weight: retrospective study using Millennium Cohort. *BMC Public Health*. 81(7):1-6.
29. Lehtovirta P, Forss M 1978 The acute effect of smoking on intervillous blood flow the placenta. *Br J Obstet Gynaecol*. 85:729-1.
30. Pollard I 1984 Effects of stress administered during pregnancy on reproductive capacity and subsequent development of the offspring of rats - prolonged effects on the litters of a 2nd pregnancy. *Journal of Endocrinology*. 100(3):301-6.

31. Grotta LJ, Ader R 1969 Continuous recording of maternal behaviour in *rattus norvegicus*. *Anim. Behav.* 17:722-9.
32. Levin R, Stern JM 1975 Maternal influences on ontogeny of suckling and feeding rhythms in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 89:711-21.
33. Moriceu S, Sullivan RM 2005 Neurobiology of infant attachment. *Developmental Psychobiology.* 47:230-42.

TABELA 1

Tabela 1 – Média seguida do desvio padrão e intervalo de confiança [95%] do peso corporal (g) inicial e final das ratas.

GRUPOS	PESO INICIAL	PESO FINAL
GF	229,5 ± 14,0	261,1 ± 38,2
	[214,7 – 244,3]	[221,0 – 301,3]
GC	236,2 ± 12,7*	285,7 ± 30,3
	[222,8 – 249,5]	[253,9 – 317,5]
GFN	227,2 ± 18,78*	281,4 ± 20,5
	[207,5 – 246,9]	[255,9 – 307,0]
GN	231,3 ± 8,2*	275,04 ± 34,0
	[221,1 – 241,6]	[232,8 – 317,3]

GF: exposto à fumaça de cigarro, GC: controle, GFN: exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação, e GN: submetido ao programa de natação. * Diferença significante entre peso inicial e peso final. Considere: $p < 0,05$.

FIGURA 1

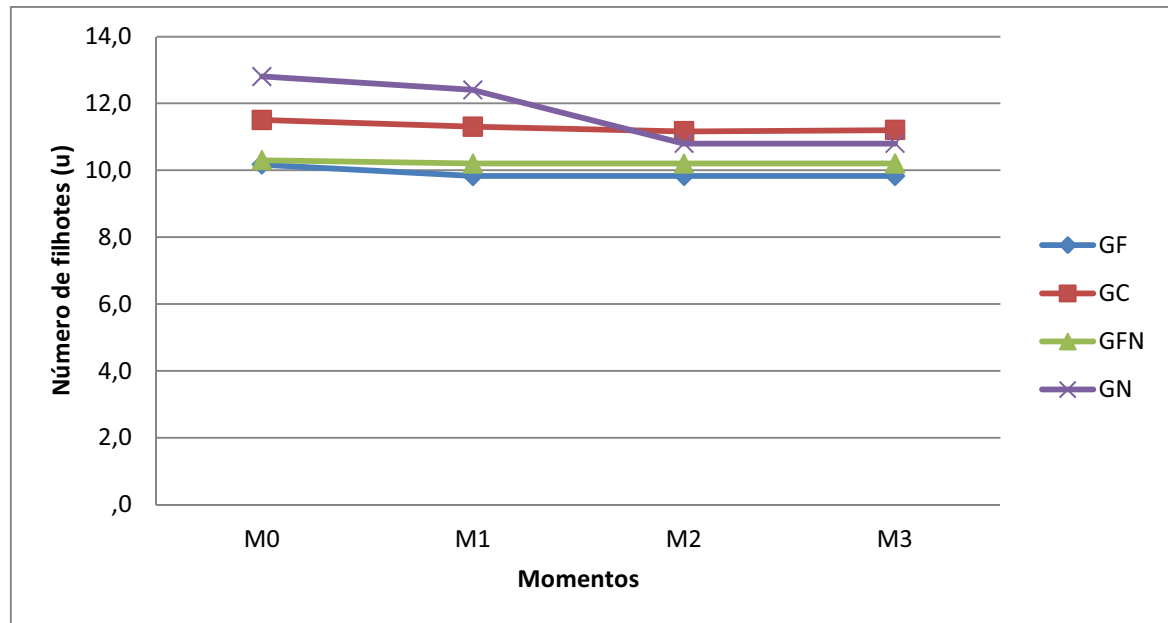


Figura 1 – Média do número de filhotes dos grupos: exposto à fumaça de cigarro (GF), controle (GC), exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação (GFN) e submetido ao programa de natação (GN), em quatro momentos distintos: no nascimento (M0), com sete dias de amamentação (M1), com 14 dias de amamentação (M2) e com 21 dias de amamentação (M3). Considere: $p < 0,05$.

TABELA 2

Tabela 2 – Índice de correlação de Spearman do número de filhotes por rata com peso (g) e comprimento (cm) corporal dos filhotes.

		Número de filhotes			
		M0	M1	M2	M3
Peso Corporal (g)	GF	0,319	-0,058	-0,462	-0,348
	GC	-0,754	-0,794	-0,794	-0,883*
	GFN	0,464	0,500	-0,118	0,177
	GN	-0,700	-0,564	0,00	0,00
Comprimento Corporal (cm)	GF	0,319	0,232	-0,051	-0,174
	GC	-0,638	-0,794	-0,794	-0,794
	GFN	0,029	0,647	0,353	0,265
	GN	-0,700	-0,205	0,316	0,00

GF: exposto à fumaça de cigarro, GC: controle, GFN: exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação, e GN: submetido ao programa de natação. Momentos: nascimento (M0), sete dias de lactação (M1), 14 dias de lactação (M2) e 21 dias de lactação (M3). * Diferença significativa da correlação de Spearman. Considere: $p < 0,05$.

FIGURA 2

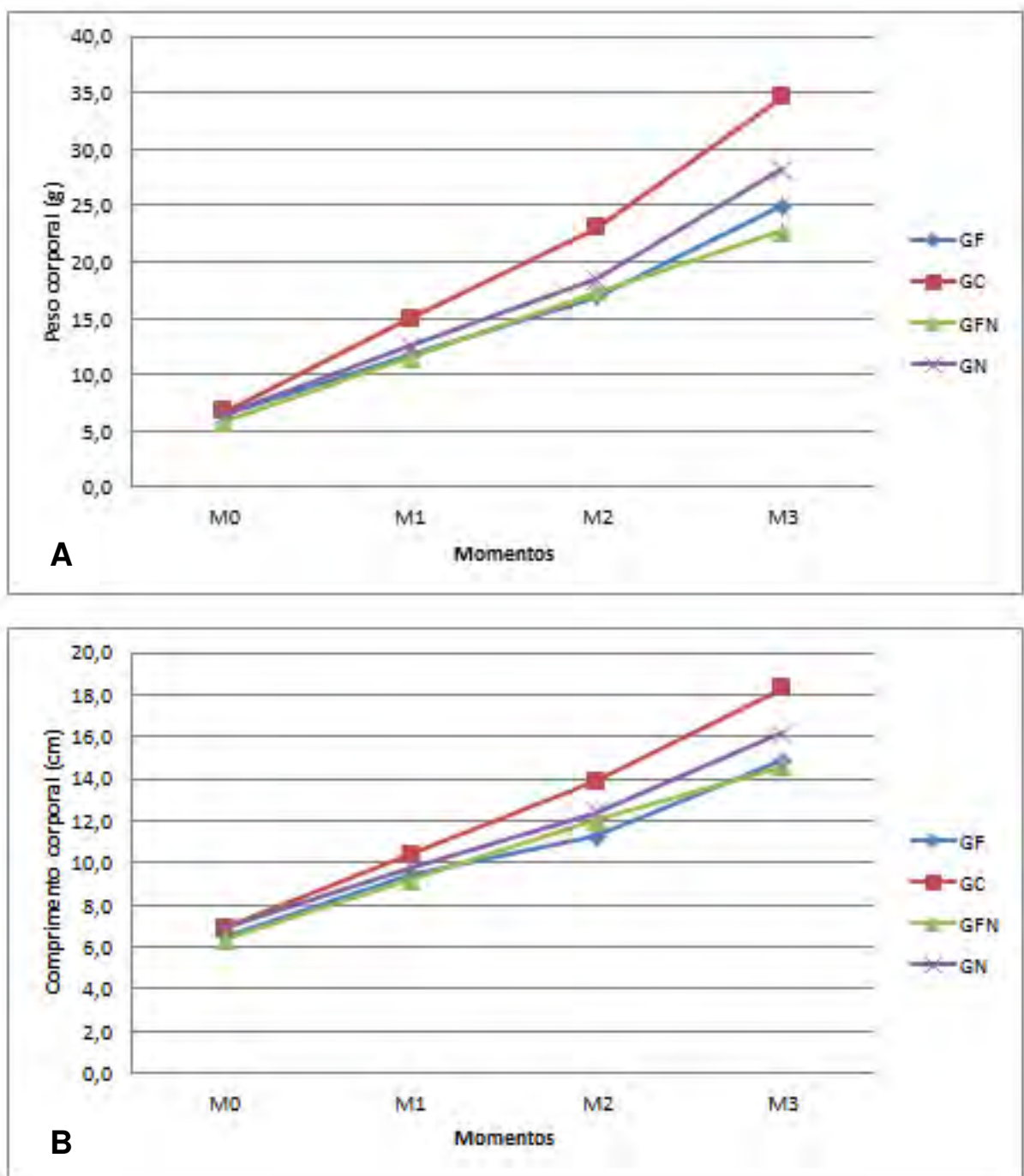


Figura 2 – A - Média do peso corporal dos filhotes; B - Média do comprimento corporal dos filhotes. Grupos: exposto à fumaça de cigarro (GF), controle (GC), exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação (GFN) e submetido ao programa de natação (GN). Momentos: nascimento (M0), sete dias de lactação (M1), 14 dias de lactação (M2) e 21 dias de lactação (M3). Considere: $p < 0,05$.

TABELA 3

Tabela 3 – Delta do peso (g) e do comprimento (cm) corporal dos filhotes entre os momentos.

	Grupo	Delta 1	Delta 2	Delta 3
Peso Corporal (g)	GF	5,3	5,2	8,1
	GC	8,2	8,0	11,5
	GFN	5,7	5,8	5,4
	GN	5,9	5,9	9,8
Comprimento Corporal (cm)	GF	2,9	1,9	3,6
	GC	3,5	3,5	4,4
	GFN	2,8	2,8	2,6
	GN	2,9	2,6	3,8

GF: exposto à fumaça de cigarro, GC: controle, GFN: exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação, e GN: submetido ao programa de natação. Delta 1: diferença entre nascimento (M0) e 7 dias de lactação (M1); Delta 2: diferença entre 7 dias de lactação (M1) e 14 dias de lactação (M2); Delta 3: diferença entre 14 dias de lactação (M2) e 21 dias de lactação (M3).

TABELA 4

Tabela 4 – Média seguida do desvio padrão do peso (g) e morfometria (μm) do músculo gastrocnêmio dos filhotes.

Grupos	Gastrocnêmio	
	Peso (g)	Morfometria (μm)
GF	$0,08 \pm 0,03^{a,c}$	$12,96 \pm 2,31$
GC	$0,16 \pm 0,05^{d,e}$	$15,78 \pm 3,62^*$
GFN	$0,07 \pm 0,02^f$	$11,67 \pm 1,17$
GN	$0,11 \pm 0,02$	$13,12 \pm 0,61$

GF: exposto à fumaça de cigarro, GC: controle, GFN: exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação, e GN: submetido ao programa de natação. Letras correspondem a presença de diferença estatisticamente significativa entre: ^a GF e GC; ^b GF e GFN; ^c GF e GN; ^d GC e GFN; ^e GC e GN; ^f GFN e GN. * Diferença significativa entre GC e GFN. Considere: $p < 0,05$.

Conclusões

Em síntese, este estudo mostrou que o exercício físico intensificou as alterações morfológicas e histoquímicas causadas pelo tabagismo passivo no músculo esquelético de ratas durante a prenhez e lactação, entretanto não influenciou a medida de menor diâmetro das fibras musculares, e nem os tipos de fibras, assim como o tabagismo passivo.

Com relação à prole, observou-se que o tabagismo passivo materno durante prenhez e lactação exerceu forte influência negativa sobre o número de filhotes, sobre o peso e comprimento corporal dos mesmos do nascimento ao desmame, bem como sobre seu desenvolvimento muscular. Por outro lado, o exercício por meio do programa de natação influenciou positivamente tais aspectos no momento do nascimento, mas que pelo maior gasto energético requerido não possibilitou os mesmos benefícios durante todo o período de lactação. E por fim, verificou-se que associação do tabagismo passivo com o exercício físico gerou somatização de estresse, que influenciou negativamente as medidas analisadas, e dessa forma, a hipótese levantada neste estudo foi derrubada.

Referências

1. Rogers JM. Tobacco and pregnancy. *Reproductive Toxicology*. 2009; 28:152–160.
2. Brownson RC, Figgs LW, Caisley LE. Epidemiology of environmental Tobacco smoke exposure. *Oncogene*. 2002; 21:7341-7348.
3. Bello S, Sergio MH, Susana SI, Marina et al. Efectos de la exposición al humo de tabaco ambiental en no fumadores. *Rev. chil. enferm. respir.* 2005;21(3):179-192.
4. Furtado RD. Implicações anestésicas do tabagismo. *Rev Bras Anesthesiol.* 2002;52:354-367.
5. Gonçalves-silva RMG, Lemos-santos MG, Botelho C. Influência do tabagismo no ganho ponderal, crescimento corporal, consumo alimentar e hídrico de ratos. *J. Pneumol.* 1997; 23(3):124-30.
6. Wünsch Filho V, Mirra AP, López RVM, Antunes LF. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol.* 2010; 13(2):175-87.
7. Cabar FR, Carvalho FRC, Carvalho JP. Efeitos do tabagismo na saúde da mulher. *Femina.* 2003; 31(4):373-5.
8. Mello PR, Pinto GR, Botelho C. The influence of smoking on fertility, pregnancy and lactation. *J Pediatr.* 2001; 77:257-64.
9. Mello PRB, Okay TS, Botelho C. Influência da exposição à fumaça lateral do cigarro sobre o ganho de peso e o consumo alimentar de ratas gestantes: análise do peso e do comprimento dos filhotes ao nascimento. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2006; 28(3): 143-50.
10. Alves MR. Influência da nicotina, durante a gestação e lactação, na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes: estudo tensiométrico,

- morfométrico e imunoistoquímico. 2006, Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
11. Brandini DA, Sala MA, Lopes RA, Semprini M, Contrera MGD. Effects of Cigarette Smoke on the Meckel's Cartilage of Rat Fetus: Morphologic, Morphometric and Stereologic Study. *Braz Dent. J.* 2005;16(1):62-66.
 12. Rozov T, Fiss E, Catherino P, Perestrelo MI, Nomura M. Hábito de fumar das gestantes e parturientes de um hospital universitário e seus conhecimentos sobre os efeitos do fumo em fetos e lactentes. *Arq. Med. ABC.* 2004; 29(1):28-36.
 13. Batista DC, Chiara VL, Gugelmin AS, Martins PD. Atividade física e gestação: saúde da gestante não atleta e crescimento fetal. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.* 2003; 3(2):151-8.
 14. Cavalcante SR, Cecatti JG, Pereira RI, Baciuk EP, Bernardo AL, Silveira C. Water aerobics II: maternal body composition and perinatal outcomes after a program for low risk pregnant women. *Reproductive Health.* 2009; 6(1):1-7.
 15. Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation.* 2002;81(11):S40-S51.
 16. Chattopadhyay K, Chattopadhyay BD. Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein. *Indian J Med Res.* 2008;127:571-576.
 17. Montes de Oca M, Loeb E, Torres SH, De Sanctis J, Hernández N, Tálamo C. Peripheral muscle alterations in non-COPD smokers. *Chest.* 2008;131(1):13-18.

18. Bachir-Lamrini LB, Sempore B, Mayet M-H, Favier RJ. Evidence of a slow-to-fast fiber type transition in skeletal muscle from spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 1990; 258:352–357.

Anexo I

BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH
- INSTRUÇÕES AOS AUTORES -

Objetivo e Política

O Brazilian Journal of Medical and Biological Research é uma revista de publicação eletrônica mensal que conta com processo de avaliação pelos pares, especialistas das diferentes áreas.

A Revista é de responsabilidade da Associação Brasileira de Divulgação Científica (ABDC).

A finalidade do Brazilian Journal of Medical and Biological Research é publicar resultados de pesquisas originais que contribuam significativamente para o conhecimento das ciências médicas e biológicas.

Será dada preferência para manuscritos que desenvolvam novos conceitos ou abordagens experimentais e que não sejam meramente agrupamento de dados científicos.

Trabalhos metodológicos poderão ser submetidos para publicação desde que descrevam novos princípios ou um aperfeiçoamento significativo de métodos já existentes.

Não serão aceitos para publicação, à menos que os autores demonstrem a originalidade do trabalho:

- trabalhos em seres humanos sem aprovação de comitê de ética ou sem declaração de consentimento do interessado ou guardião legal
- trabalhos não aprovados pelo comitê de ética e cuidados com animais
- trabalhos que relatem resultados preliminares ou que apenas confirmem resultados anteriores.
- Trabalhos que tratem da tradução para o português de um teste já publicado sem envolver investigação original.
- Trabalhos que utilizem questionários traduzidos de uma linguagem para outra e sua validação em pacientes locais
- Trabalhos que abordem a adaptação transcultural e validação de instrumentos de medida.

Quando apropriado, trabalhos na área de Investigação Clínica deverão conter uma declaração indicando que o protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética do hospital (Hospital no qual pelo menos parte da pesquisa tenha sido desenvolvida e ao qual pelo menos um dos autores seja associado) e que o consentimento escrito foi obtido de todos os participantes.

O encaminhamento de um manuscrito ao Brazilian Journal implica que os dados não tenham sido previamente publicados e que, enquanto estiver em processo de revisão, não está sendo submetido concomitantemente à consideração de outras revistas. A Revista considera "publicação anterior" as seguintes situações: qualquer material impresso com mais de 500 palavras descrevendo resultados ou métodos de um manuscrito enviado para publicação ou já na fase de impressão; tabelas ou ilustrações publicadas que apresentem o conteúdo do manuscrito; manuscritos ou pôsteres disponíveis na Internet. Quando parte do material foi apresentado em uma comunicação preliminar ou em um simpósio sem revisores, este fato deve ser citado como uma nota de rodapé na página do título e uma cópia deve acompanhar o trabalho.

Page Charges

Os autores serão responsáveis pelo pagamento de "page charges" que será cobrada do autor de correspondência ou de pessoa ou instituição por ele indicados, no momento em que o trabalho for aceito para publicação.

Para trabalhos submetidos depois de 5 de Janeiro de 2009 o custo será de R\$1.250,00/trabalho de autores brasileiros e de US\$550,00/trabalho para autores fora do Brasil independentemente do número de páginas do trabalho.

Sugerimos que os autores solicitem a assistência do Chefe de Departamento, Diretor da Instituição, Pró-Reitor de Pesquisa ou de Pós-Graduação da Universidade, ou localize verbas relacionadas à pesquisa ou reserva técnica de bolsas de pós-graduação, quando aplicável. A publicação de um trabalho contribui com o prestígio do Departamento, da Faculdade, da Universidade e da área de Pós-Graduação.

No Brasil o pagamento de "page charges" será feito através da quitação de boleto bancário que será remetido ao autor de correspondência quando o trabalho for aceito. No exterior, será solicitado ao autor de correspondência a emissão de cheque em dólares, contra um banco americano.

Qualquer dúvida favor entrar em contato com Reinaldo de Souza, via email (bjournal@fmrp.usp.br).

Submissão de Manuscritos

Complete e envie o [formulário de submissão](#).

Envie um email ao bjournal@terra.com.br ou bjournal@fmrp.usp.br com a carta de submissão e o manuscrito em anexo.

A carta de submissão deve conter as seguintes informações:

- Título do trabalho que está sendo submetido
- Nome do(s) autor(es).
- Enviar via fax para 0xx-16-3633-3825 ou 0xx-16-3630-2778 uma declaração assinada pelo autor de correspondência de que foi obtida permissão das pessoas mencionadas em "agradecimentos"
- Se uma versão do manuscrito foi previamente submetida à publicação pelo Brazilian Journal ou outra revista, inclua comentários dos revisores e a indicação de como os autores responderam a esses comentários.
- Quando adequado
 1. os trabalhos na área de Investigação Clínica devem incluir uma declaração indicando que o protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética do hospital (hospital a que pelo menos um dos autores esteja associado) e devem ser obtidos consentimento por escrito de todos os participantes,
 2. que a utilização dos animais de experimentação seguiu as regras estabelecidas pela instituição local

Apresentar a permissão para a reprodução de figuras e tabelas de outros trabalhos.

Categorias de Artigos

Oito ou nove números do Brazilian Journal serão dedicados à **Biociências** e o autor deverá especificar no formulário de submissão, em qual das seguintes sessões ele prefere publicar seu trabalho:

- Biologia Celular
- Biologia Experimental
- Bioquímica e Biologia Molecular
- Farmacologia
- Fisiologia e Biofísica
- Imunologia
- Neurociências e Comportamento

Três ou quatro números por ano serão dedicados à **Investigação Clínica** e o autor deve especificar no formulário de submissão, em qual das seguintes sessões ele prefere publicar seu trabalho:

- Técnicas e instrumentos analíticos, diagnósticos ou terapêuticos
- Sangue, imunologia e transplante de órgãos
- Aparelho cardiovascular e respiratório, e medicina esportiva
- Aparelho digestivo
- Doenças endócrinas, nutrição e metabolismo
- Fatores ambientais das doenças
- Atenção à saúde
- Agentes e doenças infecciosas
- Rim e meio extracelular
- Medicina neonatal, crescimento e desenvolvimento
- Oncologia
- Processos psicológicos, comportamento e doenças mentais
- Medicina reprodutiva
- Sistemas esquelético, muscular e nervoso
- Pele e tecido conjuntivo
- Procedimentos cirúrgicos, anestesia e analgesia

Trabalho completo (full-length paper). Deve especificar claramente um objetivo ou hipótese, o projeto experimental e métodos (inclusive o local de origem do estudo e o período de realização, pacientes ou participantes com critérios de inclusão e exclusão, ou fontes de dados e como eles foram selecionados para o estudo). Deve fornecer os dados essenciais de quaisquer intervenções, os resultados mais importantes do estudo, as avaliações mais importantes dos resultados, uma seção de comentários colocando os resultados no contexto da literatura existente e as conclusões. Esses trabalhos devem conter:

- resumo (não mais de 250 palavras)
- palavras chaves (não mais que 6)
- título resumido a ser usado no topo das páginas, não deve exceder 60 letras e espaços
- o texto **deve** ser dividido em sessões (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), sem separação específica para conclusões.

- não mais que 40 referências
- autores devem especificar na carta de submissão que o trabalho está sendo submetido como full paper.

Comunicação breve (short communication). Comunicações breves são relatos a respeito de um único assunto que deve ser conciso mas definitivo. Pares ou seqüências de trabalhos não serão aceitos. Pretende-se que esta seção tenha grande abrangência e englobe metodologia e dados experimentais a respeito de assuntos de interesse dos leitores da Revista. Deve conter:

- abstract não mais de 250 palavras
- palavras chaves, não mais que 6
- título resumido a ser usado no topo das páginas, não deve exceder 60 letras e espaços
- o texto **deve** ser dividido em sessões (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), sem separação específica para conclusões.
- deve ter no máximo 2 figuras ou tabelas (ou uma de cada).
- não mais que 20 referências
- autores devem especificar na carta de submissão que o trabalho está sendo submetido como Short communication.

Artigo de revisão ou Mini-revisão. Um artigo de revisão deve conter uma análise sintética e crítica de uma área relevante e não deve conter meramente uma descrição cronológica da literatura. O artigo de revisão devem ser elaborado por pesquisador que tenha contribuições importantes para uma área específica das ciências médicas e biológicas e será publicado à convite dos Editores. Contudo, um esboço de um artigo de revisão pode ser enviado aos Editores para análise, sem consulta prévia. Se for julgado adequado o autor será comunicado e poderá preparar uma revisão para ser julgada pelos pares, com vistas à publicação.

Não serão aceitos "relatos" do tipo encontrado em introduções de dissertação ou tese ou pesquisas de assuntos efetuados em Medline ou Pubmed.

Deve conter:

- Um resumo com no máximo 250 palavras
- Não mais que 6 palavras-chave
- título resumido a ser usado no topo das páginas, não deve exceder 60 letras e espaços
- O texto deve ser dividido em sessões com títulos e subtítulos apropriados.
- não mais que 60 referências
- autores devem especificar na carta de submissão que o trabalho está sendo submetido como Review article
- Informação na carta de submissão se o trabalho deverá ser publicado em um número dedicado a Biociências ou à Investigação Clínica.

Concepts and Comments

A Sessão de Concepts and Comments é uma plataforma para apresentação de idéias, teorias e visões. A apresentação deve seguir as instruções de Short Communication e deve ter um resumo, 6 palavras chaves, running title, não mais que 20 referências e não mais que duas tabelas ou figuras.

Case Report

Deve ter pelo menos uma das seguintes características para ser publicado pela revista

- ser de especial interesse da comunidade clínica.
- um caso raro, particularmente útil para demonstrar o mecanismo ou a dificuldade no diagnóstico
- um novo método diagnóstico
- um novo tratamento ou um tratamento modificado
- um texto que demonstre achados relevantes, bem documentado e sem ambiguidade

Overview

- Não deve conter dados não publicados

Deve apresentar o ponto de vista do autor de uma forma menos rigorosa que em uma revisão regular ou em uma mini-revisão, e ser do interesse do leitor geral.

Biologia Celular

A principal característica dos trabalhos de pesquisa na área de Biologia Celular é a ênfase na integração de informações de natureza bioquímica, molecular, genética, fisiológica ou patológica no contexto da célula. Esta sessão considera trabalhos relacionados a quaisquer sistemas biológicos, procariótico ou eucariótico, em qualquer fase de seu desenvolvimento.

Para o Brazilian Journal, todos os trabalhos que abordem aspectos da estrutura e função celular são considerados dentro do escopo da Biologia Celular. Os Editores encorajam a submissão de trabalhos

que explorem a Biologia Celular como uma área de convergência de diversas áreas de pesquisa, especialmente aqueles que permitam uma melhor compreensão das bases celulares da imunologia, neurobiologia, interação parasita-hospedeiro, desenvolvimento e bases celulares das doenças. Trabalhos com observações puramente descritivas não serão publicados. Trabalhos descrevendo novas técnicas serão publicados somente quando adequadamente validados e julgados pelos Editores como representativos de avanços de excepcional significado.

Atividade biológica de produtos naturais

A Revista considerará para publicação trabalhos que descrevam atividade de substâncias de origem biológica, somente se os seguintes critérios forem preenchidos:

- Os trabalhos devem descrever a separação do material bruto em frações (não necessariamente em materiais homogêneos) com as frações contendo atividade biológica identificada claramente no esquema de separação.
- Estudos fitoquímicos devem ser acompanhados por testes biológicos.
- Explorações descritivas de atividades farmacológicas de extratos de plantas ou chás não serão considerados para publicação.
- Além da demonstração da atividade em um ou mais sistemas biológicos, deverão ser realizados experimentos visando fornecer informação sobre os mecanismos de ação das substâncias que estão sendo testadas.
- Para permitir repetição da preparação de frações e ensaios biológicos usados, suficiente informação experimental deve ser fornecida.
- A origem deve ser completamente identificada, e, se o material for planta, a espécie deve ser classificada por um especialista e depositada em um jardim botânico local, universidade ou instituto de pesquisa.
- O nome e instituição da pessoa que classificou a planta e o número de registro em que se encontra depositada deve ser fornecido na sessão de Material e Métodos.

A Revista não publica estudos toxicológicos

Informações quanto à autoria

Requisitos para autoria. Apenas aquelas pessoas que contribuíram diretamente para o conteúdo intelectual do trabalho devem ser listadas como autores. Os autores devem satisfazer a todos os seguintes critérios, de forma a poderem ter responsabilidade pública pelo conteúdo do trabalho:

- ter concebido e planejado as atividades que levaram ao trabalho ou interpretado os resultados a que ele chegou, ou ambos.
- ter escrito o trabalho ou revisado versões sucessivas e tomado parte no processo de revisão.
- ter aprovado a versão final.

Exercer posição de chefia administrativa, contribuir com pacientes e coletar e agrupar dados, embora importantes para a pesquisa, não são, por si só, critérios para autoria. Outras pessoas que tenham feito contribuições substanciais e diretas para o trabalho mas que não possam ser consideradas autores podem, com sua permissão, ser citadas na seção "Agradecimento", poderá ser feito com permissão da pessoa que está sendo agradecida e se possível, a contribuição específica deve ser descrita. Incluir os esclarecimentos sobre os critérios de autoria e responsabilidade na carta de submissão, que deve ser lida por todos os autores e assinada por pelo menos um deles.

Direitos autorais. A maioria das determinações do Decreto Norte-Americano sobre Direitos Autorais de 1976 tornaram-se efetivas em 1º de janeiro de 1978. Portanto, **os manuscritos devem ser acompanhados por declaração escrita, assinada pelos autores e encaminhada via correio normal (ver modelo abaixo).**

"O(s) autor(es) abaixo assinado(s) transfere(m) todos os direitos autorais do manuscrito (título do artigo) a Brazilian Journal of Medical and Biological Research, caso o trabalho seja publicado. O(s) signatário(s) garante(m) que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado anteriormente. O(s) autor(es) confirma(m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s)".

Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente de Brazilian Journal of Medical and Biological Research e não podem ser publicados sem permissão escrita da revista.

Permissão para reprodução. A Revista foi registrada no Copyright Clearance Center, Inc., 222 Rosewood Dr., Danvers, MA 01923. Consentimento para a cópia de artigos para uso pessoal ou interno pode ser dado para clientes específicos. Este consentimento é dado com a condição de que o interessado na cópia pague diretamente ao Copyright Clearance Center para cópias além do

permitido pela Lei Norte-americana de Direitos Autorais. Este consentimento não se estende a outros tipos de direitos autorais, tais como para distribuição geral, revenda, propaganda e propósitos promocionais, ou para a criação de novos trabalhos coletivos.

Todas as outras solicitações relacionadas a material protegido pelos direitos autorais desta publicação, que não possam ser resolvidas através do Copyright Clearance Center, devem ser dirigidas por escrito a Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil. Fax: +55-16-3633-3825. E-mail: bjournal@fmrp.usp.br ou bjournal@terra.com.br

Para solicitar permissão, por favor envie-nos uma requisição via e-mail, via fax ou pelo correio com as seguintes informações:

- Seu nome, título e instituição
- Seu endereço completo para correspondência, número do telefone, número do fax e e-mail
- Ano da publicação, número do volume e data do artigo
- Título do artigo
- Nomes dos autores
- Número das páginas em que o material aparece
- Número da figura ou porção específica do texto (ou forneça uma fotocópia)
- Inclua as seguintes informações sobre o uso que se pretende:
- Título do livro/revista em que o material do Brazilian Journal aparecerá
- Autor(es)/editor(es)
- Editora

Revisão editorial e processamento

Para informações mais completas sobre a política de revisão editorial veja "[Editorial policies.htm](#)"

O recebimento de manuscritos é acusado imediatamente. Quando o trabalho é avaliado, os autores são notificados à respeito da decisão editorial.

Os manuscritos aceitos são editados e as provas gráficas serão enviadas aos autores para a correção de erros de impressão. Os autores são responsáveis por todas as afirmações feitas em seu trabalho, incluindo alterações feitas pelo editor e autorizadas pelo autor de correspondência.

As datas de recebimento e aceitação serão publicadas em cada artigo. Espera-se que os autores retornem os trabalhos em 15 dias após o recebimento para modificações ou na correção de Estilo e que retornem as provas gráficas em 72 horas após o recebimento. O número total de dias adicionais dispendidos pelos autores serão acrescentados à data de submissão no momento da publicação.

Preparação de Manuscritos

Os manuscritos devem ser escritos em Inglês. Solicita-se aos autores que usem o inglês americano, exceto, naturalmente, nas referências, cujos títulos devem aparecer exatamente como publicadas. Orientações sobre gramática, pontuação e escrita científica podem ser encontradas nas seguintes fontes: Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers. 7th edn. Rockefeller University Press, Reston, 2006; Medical Style and Format. Huth EJ (Editor). ISI Press, Philadelphia, 1987, Marketed by Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

O Brazilian Journal of Medical and Biological Research segue o formato de referências de "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", que pode ser encontrado no website de National Library of Medicine (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Formato do texto

Solicitamos que os textos sejam remetidos sob a forma de arquivo do Microsoft Word criado com MS Word versão 6.5 ou uma versão posterior.

- **Mande o manuscrito por e-mail**, em folha tamanho carta (8,5 x 11"), com margens com pelo menos 1 polegada (2,54 cm) de largura, 23 linhas por página, que contenha cerca de 2156 caracteres, incluindo espaços.
- Use fonte serifada, preferivelmente **Times New Roman**, com **12 pontos** e **espaço duplo** em todo o trabalho, incluindo página de título, resumo, texto, agradecimentos, referências bibliográficas, legendas das figuras e tabelas.
- A numeração das páginas deve ficar no canto superior direito, começando com a página de título como página 1.
- Expressar todas as medidas em Système International (SI) e unidades padrão quando apropriado (<http://www.physics.nist.gov/cuu/units>).
- Não use abreviações no título ou no resumo e limite seu uso no texto.

- A extensão do manuscrito e o número de tabelas e figuras devem ser os menores possíveis.
- Verifique se todas as referências bibliográficas foram citadas no texto.
- Nomes genéricos devem ser usados para todas as drogas. Os instrumentos podem ser citados pelo nome comercial; o nome e a localização do fabricante (cidade, estado, país e email) devem ser dados entre parênteses no texto.

Rodapé, se for imprescindível deve ser numerado, super-escrito, consecutivamente no texto e deve ser apresentado em uma página à parte após o resumo.

Títulos e Subtítulos

- Utilize somente três tipos de títulos no texto. Indique claramente o nível do título usando as convenções tipográficas abaixo.
- A posição de todos os títulos e subtítulos deve ser à esquerda da margem.
- Procure usar títulos breves (3 ou 4 palavras), não utilize abreviações.

Primeiro Nível: **Bold**, somente com a primeira letra da primeira palavra em maiúsculo, fonte tamanho 11.

Segundo Nível: **Bold**, com a primeira letra da primeira palavra em maiúsculo, fonte tamanho 9

Terceiro Nível: *Itálico*, somente a primeira letra da primeira palavra em maiúsculo.

Abreviações e símbolos

- Favor utilizar o mínimo de abreviações possível.
- Quando uma abreviação aparece pela primeira vez, no texto, figura ou legenda de tabela, explique seu significado.
- Não é necessário explicar abreviações de unidades de medida: 3 milliliters, simplesmente 3 ml ou símbolos científicos comuns como sodium, basta dizer Na.
- Abrevie nomes longos ou substâncias químicas e termos utilizados para combinações terapêuticas.
- Abrevie nomes de testes e procedimentos que são conhecidos mais por suas abreviaturas do que por seus nomes completos (VDRL test, SMA-12).
- Use abreviações em figuras e tabelas para ganhar espaço, mas as abreviações devem ser sempre definidas na legenda.

Unidades. O Système International (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) em unidades métricas é usado para unidades e abreviações de unidades

Ex: s para segundo, min para minuto, h para hora, L para litro, m para metro, kDa para massa em kilodaltons, 5 mM ao invés de 5×10^{-3} M or 0.005

Primeira Página

Título do trabalho. O título deve ser tão breve e informativo quanto possível, não deve conter abreviações.

Ex: Beneficial effect of recombinant human growth hormone on the intestinal mucosa barrier of septic rats

Autores: Iniciais do nome e sobrenome de todos os autores com números super-escritos identificando a instituição de cada autor.

Ex: M.I. Hiyane^{1,2}, S.B. Boscardin² and M.M. Rodrigues^{1,2}

Instituição: Instituição de cada autor, identificada com o número super-escrito (Departamento, Faculdade, Universidade, Cidade, Estado e País). Quando um autor for do Brasil, o nome da instituição deve estar em português.

Ex: ¹Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica, ²Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Título Resumido: O título resumido será utilizado no topo das páginas. Não deve exceder 60 letras e espaços.

Ex: A pyrazolyl-thiazole derivative causes antinociception

Palavras Chaves: Deve ser incluída uma lista de não mais que 6 palavras chaves ou termos de indexação. A revista recomenda o uso de termos utilizados no Index Medicus para evitar o uso de sinônimos para indexar diferentes trabalhos sobre um mesmo assunto. Lembre-se, as palavras chaves serão utilizadas pelo Banco de Dados do Scielo para indexar seu trabalho (veja o "search" em <http://www.bjournal.com.br> ou <http://www.scielo.br/bjmb>).

Ex: NPA-PCR method, T-cell receptor, *Trypanosoma cruzi*, Trans-sialidase

Agradecimento: Agradecimento a financiadoras de pesquisa e bolsas (agência e número do grant).

Ex: Research supported by FAPESP and CNPq. M.I. Hiyane and M.M. Rodrigues are recipients of fellowships from CNPq. S.B. Boscardin was the recipient of a fellowship from FAPESP.

Endereço de correspondência: Nome, endereço de correspondência incluindo CEP da cidade, telefone, fax e email do autor que receberá toda correspondência relacionada ao trabalho em questão.

Ex:	Address	for	correspondence:
M.M.	Rodrigues,	CINTERGEN,	EPM, UNIFESP
Rua		Mirassol,	207
04044-010	São	Paulo,	SP, Brasil.
Fax:			+55-11-5571-1095
E-mail:	mrodrigues@ecb.epm.br		

Resumo

- Como o resumo é publicado separadamente por serviços de informação, ele deve ser compreensível e despertar o interesse na leitura do artigo completo, deve conter dados numéricos suficientes que possam ser avaliados pelo leitor que pode não ter acesso ao artigo completo.
- O resumo deve apresentar breve e claramente o problema, a abordagem experimental, os novos resultados, sobre a forma de dados quantitativos.
- Dados estatisticamente significantes devem ser reportados em forma numérica com mean \pm SEM or SD.
- Deve indicar Objetivos, Métodos e Resultados mais importantes, sem destacar os tópicos. Após Resultados deve ser informado o que é novo na pesquisa e sua importância.
- O resumo não deve exceder 250 palavras e deve ser escrito em parágrafo único com espaço duplo, em uma folha separada após a página de título.
- abreviações devem ser evitadas e se necessárias precisam ter a explicação correspondente.
- Se o uso de uma referência bibliográfica for inevitável, a citação completa deve ser dada dentro do resumo.
- Note que o Brazilian Journal **não** publica resumos estruturados.
- Sugestões mais detalhadas de [como escrever um bom resumo](#)

Introdução. Deve informar o objetivo da investigação, a relação com outros trabalhos na área e as razões para realizar a pesquisa. Não é recomendada uma extensa revisão da literatura.

Materiais e Métodos. Informações suficientes devem ser dadas no texto ou por citação de trabalhos em revistas geralmente disponíveis, de modo a permitir que o trabalho possa ser repetido.

Resultados. Os resultados devem ser apresentados clara e concisamente. Tabelas e figuras devem ser usadas apenas quando necessárias para a efetiva compreensão dos dados. Em algumas situações pode ser desejável combinar Resultados e Discussão em uma única seção.

Discussão. O objetivo da Discussão é interpretar os resultados e relacioná-los com conhecimentos existentes. Informações dadas em outros locais do texto podem ser citadas mas não repetidas em detalhes na Discussão.

Agradecimentos. Se necessário, agradeça brevemente assistência de cunho técnico, conselhos e assistência de colegas, etc. Apoio financeiro para a pesquisa e bolsas de estudo devem ser citados na página de título.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e reunidas após a seção de Referências.
- Todas as tabelas devem ser citadas no texto em ordem numérica.
- Cada tabela deve ser digitada com espaço duplo em uma folha separada (ou, se for excepcionalmente grande ou que requeira símbolos especiais ou algum arranjo não usual, a tabela deve ser enviada como uma imagem em um arquivo .tif ou .jpg).
- Um título descritivo e uma legenda, conforme as regras da revista, devem tornar as tabelas compreensíveis sem necessidade de consulta ao texto (veja www.bjournal.com.br).
- Defina todas as abreviações nas legendas das tabelas, mesmo que estejam definidas no texto.

Linhas verticais e diagonais não devem ser usadas nas tabelas; ao invés disso, afastamentos e espaçamento vertical ou horizontal devem ser usados para agrupar os dados.

Gráficos

- **Aceitamos** figuras no formato **.tif, .jpg, .cdr ou .eps** preparadas preferentemente com Adobe Photoshop ou Corel Draw. Gráficos criados com Microsoft Word ou Excel, devem

ser salvos na extensão original do arquivo (.doc ou .xls) **Não devem ser copiadas ou coladas** de um programa para outro.

- **Não aceitamos** imagens elaboradas em alguns programas tais como Microsoft Office (Access), Corel Perfect Office (WordPerfect, Quattro Pro, Presentations), Lotus SmartSuite (Freelance Graphics, 1-2-3, Approach, WordPro), Harvard Graphics e SigmaPlot porque elas não são geradas com a resolução necessária para uma publicação impressa. Mesmo quando salvas como .jpg ou similar não poderão ser aceitos pois a resolução não tem qualidade.
- **Atenção** - As figuras devem ser desenhadas profissionalmente ou preparadas usando um computador e impressora de alta resolução e não devem ter mais que 21,5 x 28,0 cm. Devem ser enviadas no formato .tif, .eps ou .jpg, **com 300 dpi** de resolução.

Todas a imagens devem:

- Ter pelo menos 12.5cm de largura.
- Serem numeradas na ordem em que são citadas no texto usando números arábicos consecutivos.
- **Não inserir as figuras dentro do texto**
- Somente serão aceitos anexos no formato PC por E-mail ou em CD via correio. Para sua informação na preparação de figuras no formato .tif, .jpg or .eps veja <http://cjs.cadmus.com/da/>.
- Informação de abscissas e ordenadas ou outras informações nas figuras devem ter somente a primeira letra da palavra em maiúscula e as demais letras devem ser minúsculas. O tamanho e formato da letra deve ser uniformizado. Confira cuidadosamente as figuras antes de enviar o trabalho, para garantir que as versões adequadas estão sendo enviadas.
- **Fotomicrografias** devem incluir dados sobre a coloração e a ampliação no final da legenda para cada parte da figura. Uma barra de ampliação deve ser adicionada a cada fotomicrografia. Se não aparecer nenhum marcador com escala na figura, a ampliação original deve ser informada na legenda.
- **Adaptação/reprodução de tabelas e figuras e correspondentes permissões**
Citações das fontes originais de materiais adaptados devem usar os termos especificados pelo editor original do material. Se não houver especificação, cite os autores, o número da referência e o editor. Cartas de permissão do portador dos direitos autorais devem acompanhar os materiais citados.
- **Legendas** Digite todas as legendas em espaço duplo consecutivamente em uma folha separada. Comece cada legenda com um pequeno título. Defina todas as abreviações e símbolos usados na figura, mesmo se eles estiverem definidos no texto. Numere as figuras na ordem em que elas são citadas no texto, usando algarismos arábicos consecutivos.
- **Figuras Coloridas** Imagens coloridas devem ser RGB, com pelo menos com 300 dpi e serão publicadas sem custo adicional.
- **Figuras em "Grayscale"** Imagens com tonalidades entre o branco e o preto devem ter pelo menos 300 dpi de resolução.

Gráfico (preto e branco ou colorido) deve ser 300 dpi de resolução

Referências

Autores são responsáveis pela acuracia, completa e correta citação das referências ao longo texto. Sempre que possível as citações de referência devem estar em inglês.

A lista de referência deve estar em espaço duplo em ordem **numérica** em uma folha separada. Numere as referências na ordem em que elas forem citadas no texto pela primeira vez, usando algarismos arábicos entre parênteses. Duas ou mais referências devem ser separadas por vírgula sem espaço (1,5,7) e três ou mais referências consecutivas devem ser separadas por um hífen (4-9). O Brazilian Journal of Medical and Biological Research segue o formato de referências de "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", que pode ser encontrado no website de National Library of Medicine (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). Utilize a abreviação de revistas de Medline/PubMed.

Se o autor usar o programa "Reference Manager", [clique aqui para fazer o download do arquivo "OS" com o estilo do Brazilian Journal of Medical and Biological Research](#) e salve em seu computador e o coloque na pasta de "Styles" do programa Reference Manager. **Importante:** Quando submeter o trabalho, envie como anexo o arquivo (".rmd") produzido pelo Reference Manager.

As seguintes informações devem ser dadas na citação:

- último nome e iniciais dos 6 primeiros autores (**sem pontuação**). Se houver mais de 6 autores, depois do 6o. nome coloque "et al."

- título do artigo.
- nome da revista em itálico abreviado.
- ano da publicação, volume e páginas
- se a referência for um livro, dê também os nomes e as iniciais dos editores, da editora e a cidade.

Cite artigos de simpósios apenas se os anais foram publicados.

Ao citar um artigo ou livro aceito para publicação mas ainda não publicado, inclua o título da revista (ou o nome da editora) e o provável ano de publicação.

Referências a matérias não publicadas - por exemplo, apresentações orais em simpósios ou trabalhos não publicados (comunicações pessoais, trabalhos em preparação) - devem ser incluídas **no texto** e não na lista de referência. Envie uma carta de permissão das pessoas citadas autorizando tais citações. **Artigos enviados para publicação é considerado material não publicado** e não devem aparecer na lista de referências. Exemplo: (Santos CS, da-Silva GB, Martins LT, unpublished results).

Dê os dados completos de cada referência, incluindo uma nota do tipo "disponível em" para os documentos que podem não ser facilmente acessíveis.

Esteja certo de que as URLs usadas como referências estejam ativas e disponíveis (a data em que o autor acessou a URL deve ser incluída na referência). Para um exemplo, ver Citações de Referências Eletrônicas, abaixo.

Os autores devem apresentar as referências bibliográficas de modo correto e completo, assim como citá-las no texto corretamente.

Exemplos:

Revista

- Xu J, Liu M, Liu J, Caniggia I, Post M. Mechanical strain induces constitutive and regulated secretion of glycosaminoglycans and proteoglycans in fetal lung cells. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 6): 1605-1613.
- Poirier P, Lemieux I, Mauriege P, Dewailly E, Blanchet C, Bergeron J, et al. Impact of waist circumference on the relationship between blood pressure and insulin: the Quebec Health Survey. *Hypertension* 2005; 45: 363-367.
- The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Australia* 1996; 164: 282-284.

Artigo aceito para publicação mas ainda não publicado.

- Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CXC, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005 (in press).

"Resultados não publicados", "Comunicação Pessoal" e "trabalhos submetidos"

- (Santos CS, da-Silva GB, Martins LT, unpublished results).
- It is assumed that the author has obtained permission from the source when "personal communication" is cited.

Livro completo

- Norman IJ, Redfern SJ. *Mental health care for elderly people*. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Capítulo de livro

- Kintzios SE. What do we know about cancer and its therapy? In: Kintzios SE, Barberaki MG (Editors), *Plants that fight cancer*. New York: CRC Press; 2004. p 1-14.
- Scheuer PJ, Lefkowitz JH. Drugs and toxins. In: Scheuer PJ, Lefkowitz JH (Editors), *Liver biopsy interpretation*. 6th edn. London: WB Saunders; 2000. p 134-150.

Resumo

- Lima SM, Bonci DM, Grotzner SR, Ribeiro CA, Ventura DF. Loss of amacrine cells in MeHg-treated retinae in a tropical fish. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: E-5172 (Abstract).

Material Audio Visual

- *Physician's Desk Reference (PDR)*. Release 2003.1AX. [CD-ROM]. Montvale: Thomson PDR; 2003.

Programa de Computador

- Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. *Epi info, version 6.04: a word processing database and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers*. [Computer program]. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention; 1998.

- *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*. Version 12.0. [Computer program]. Chicago: SPSS Inc.; 2006.

Conferência, Symposium Proceedings

- Hejzlar RM, Diogo PA. The use of water quality modelling for optimising operation of a drinking water reservoir. *Proceedings of the International Conference Fluid Mechanics and Hydrology*. 1999 Jun 23-26; Prague. Prague: Institute of Hydrodynamics AS CR; 1999. p 475-482.

Citação Eletrônica

- American Academy of Ophthalmology. Diabetic retinopathy disease severity scale. *Am Acad Ophthalmol* http://www.aao.org/education/library/recommendations/international_dr.cfm; 2005.
- Simon JA, Hudes ES. Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/281/24/2289>; 1999.

Comunicação na Internet

- Developmental toxicology. <http://www.devtox.org/nomenclature/organ.php>. Accessed June 27, 2005. CAPES Statistics. <http://www.capes.gov.br/capes/portal>. Accessed March 16, 2006.
- CNPq Plataforma Lattes, "Investimentos do CNPq em CT&I". <http://fomentacional.cnpq.br/dmofomento/home/index.jsp>. Accessed March 16, 2006.

Tese/Dissertação

- Joselevitch C. Visão no ultravioleta em *Carassius auratus* (Ostariophysi, Cypriformes, Cyprinidae): estudo eletrofisiológico do sistema cone - células horizontais. [Master's thesis]. São Paulo: Instituto de Psicologia, USP; 1999.

Patente

- Larsen CE, Trip R, Johnson CR. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. Patent No. 5.529.067. Novoste Corporation; 1995.

"Report"

- WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). *Environmental health criteria: 118 Inorganic mercury*. Geneva: World Health Organization; 1991.

National Commission on Sleep Disorders Research. *Wake up America: a national sleep alert*. Washington: Government Printing Office; 1993.

Outros Links

- Writing a Good Abstract (http://www.bjournal.com.br/Instructions/html/writing_a_good_abstract.htm)
- Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication (<http://www.icmje.org/index.html>)
- The Système International (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) in metric units is used for units and abbreviations of units.
- Instructions to make quality images for publications - <http://cjs.cadmus.com/da/>
- The Editorial Policies of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research (<http://www.bjournal.com.br/Instructions/html/policies.htm>)
- Writing papers for scientific journals (<http://www.bjournal.com.br/lectures.htm>)
- How editors evaluate scientific papers for publication (<http://www.bjournal.com.br/lectures.htm>)
- Effect of Scielo open access on Brazilian scientific journals (<http://www.bjournal.com.br/lectures.htm>)
- Sense About Science (<http://www.senseaboutscience.org.uk/index.php/site/project/30/>)
- How to Read a Scientific Paper (<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc568/papers.htm>)
- PLoS Biology Guidelines for Table and Figure Preparation (http://journals.plos.org/plosbiology/figure_guidelines.php)

Anexo II

Pediatric Research

Sistema Online de submissão e revisão

Escopo da Revista

Pediatric Research publica artigos originais, revisões convidados, e comentários sobre a etiologia das doenças das crianças e dos transtornos do desenvolvimento, que se estende desde a biologia molecular à epidemiologia. Utilização de organismos-modelo e in vitro técnicas relevantes para a biologia do desenvolvimento e da medicina são aceitáveis, assim como os estudos da tradução humana.

Categorias de papéis

1. **Artigos Regulares** resultados de investigações originais de pesquisa podem ser apresentados sob a forma de um artigo regular. O manuscrito deve ser conciso e normalmente não deve exceder 5000 palavras (cerca de 20 páginas em espaço duplo, datilografado). Artigos submetidos ao periódico Pediatric Research passar por uma etapa do processo de revisão e dois, que inclui: 1) uma placa de decisão editorial imediato que determina se um manuscrito será submetido a um processo de revisão, e 2) um processo de revisão alargada em que o manuscrito é enviado fora para árbitros convocados para avaliação. Os autores devem apresentar os nomes e informações de contato (endereço institucional, telefone, fax e e-mail) de seis potenciais revisores com experiência na área de seu trabalho em sua carta.

2. **Artigos de Revisão** Resenhas manuscritos são concisos, geralmente limitado a 3750 palavras (cerca de 15 páginas em espaço duplo, datilografado), que descrevem temas críticos ou importantes novidades e descobertas na biologia do desenvolvimento e / ou patologias pediátricas, que não tenham sido resumidos em outro lugar. Porque comentários são destinados a pesquisadores de várias disciplinas, que deve dar uma visão imparcial e ser escrita para um público de cientistas e clínicos. Geralmente, o conselho editorial convidará os autores a escrever opiniões, sugestões, mas sob a forma de uma carta de intenções apresentada à Redação para apreciação pelo conselho editorial são bem vindas. A carta de intenção deve incluir o título, uma breve descrição ou resumo e uma lista dos cinco papéis-chave a ser coberto na revisão proposta.

Submissão eletrônica de manuscritos

Os autores que desejem apresentar manuscritos para Pediatric Research deve fazê-lo através da submissão do manuscrito sistema on-line, Gerente Editorial, disponível em <http://pr.edmgr.com> . Off-line, baseado em observações de papel não são mais aceitos pelo

Pediatric Research . Autores submissão on-line pela primeira vez, deve ler atentamente o Autor Tutorial disponível em <http://edmgr.ovid.com/lww-final/accounts/authT.pdf> antes da apresentação. Os manuscritos submetidos online devem aderir ao layout padrão e as diretrizes de comprimento, conforme descrito nas "Instruções aos Autores", que deve ser escrito em Inglês. Os formatos de arquivos que podem ser aceitos para o texto manuscrito inclui o Word, WordPerfect, RTF e TXT. formatos de arquivo aceitos para os valores incluem TIFF, EPS, e PowerPoint (veja abaixo as especificações figura). Os itens obrigatórios são diferentes para cada tipo de artigo e são especificados durante o upload de arquivos para revisão. Por favor, note que os resumos devem ser apresentados como arquivos de texto separado do corpo do manuscrito, bem como parte do manuscrito. Todos os autores deverão assinar uma cópia da revista, de autoria de Responsabilidade Financeira, Divulgação e Transferência de Direitos Autorais formulário e apresentá-lo no momento da submissão. assinaturas originais, não fotocópias, são exigidos. Os formulários preenchidos devem ser enviados via correio para a Investigação Pediátrica Editorial Office. Após o recebimento do formulário preenchido o manuscrito será atribuído um número único de identificação, eo processo de revisão terá início. O processo de revisão não irá começar até que a transferência de direitos autorais formulário preenchido é recebido. A data de apresentação do manuscrito original, conforme determinado pelo recebimento do formulário de direitos autorais assinada, e data de aceitação final será publicado.

Aspectos éticos e legais

A Declaração de Responsabilidade preenchido, Financeiro, Divulgação e Transferência de Direitos Autorais formulário assinado por todos os autores é exigido para todos os manuscritos, no momento da apresentação. Ao assinar a Declaração de Responsabilidade, Divulgação Financeira, e os autores formulário Transferência de Direitos Autorais verificar a sua aprovação do material enviado para publicação, que o material não está sob consideração para publicação em qualquer língua em outros lugares, e não tem sido relatado previamente em qualquer formato, incluindo publicado colóquios e apresentações, com exceção de resumos e relatórios preliminares, que devem ser devidamente citados dentro do texto. Além disso, os autores verificam que as suas Institutional Review Board aprovou todos os estudos humanos e animais, e que todos os estudos em humanos têm sido realizados com o consentimento informado. Uma declaração indicando o recebimento de consentimento informado, consentimento (quando aplicável) e aprovação do Conselho de Revisão Institucional deve ser incluída no texto do manuscrito submetido. Todas as investigações

humanos deve ser conduzida de acordo com os princípios expressos na Declaração de Helsinki (obtida por solicitação da redação).

Se qualquer relatório preliminar relacionados com exceção de um resumo foi publicado ou submetido à publicação em qualquer lugar, uma cópia deve acompanhar o manuscrito submetido à *Pediatric Research*. No momento da apresentação, os autores devem revelar qualquer acordo financeiro ou outros fatores, que podem ser vistas como tendo um potencial conflito de interesse. Essas informações serão mantidas em sigilo, enquanto o papel está em revisão e não influenciará a decisão editorial, mas se o artigo for aceito para publicação, os editores vão discutir com os autores da maneira em que essas informações podem ser comunicadas.

Embora os editores e os revisores envidarem todos os esforços para garantir a validade dos artigos publicados, a responsabilidade final cabe aos autores, não com o jornal, seus editores, ou da editora.

O registo de novos reagentes biológicos e dados.

Pediatric Research exige que informações sobre proteínas e seqüências de ácido nucleico, e os dados genéticos, proteômico e cristalográficos ser depositados em bancos de dados disponíveis publicamente antes de serem aceites para publicação. Data e número de adesão devem estar disponíveis, e observou no texto, antes da aceitação para publicação e acesso à informação na respectiva base de dados deve estar disponível no momento da publicação.

Proteína e seqüências de ácidos nucleicos. Recém-relatada ou seqüências de nucleotídeos da proteína deve ser depositado no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), o EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>) ou o DNA Dados do Banco do Japão (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>).

Genômica e estudos proteômico. Os autores dos trabalhos que incluem a genômica, proteômica, ou outros de alto throughput de dados são obrigados a apresentar seus dados à expressão de genes e de dados do NCBI matriz hibridação repositório (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Estudos cristalográficos. Os autores dos trabalhos que descrevem as determinações nova estrutura deve apresentar ao Protein Data Bank na Investigação para Tecnologias Bioinformática Estrutural <http://www.rcsb.org/pdb>.

Registro de Ensaio Clínicos. O Comitê Internacional de Editores de Periódicos Médicos (ICMJE) recomendou e exigirá que todos os randomizados e controlados estar registado para

publicação em suas revistas. Pediatric Research aprova essa política e fez inscrição no cadastro patrocinado por os EUA Library of Medicine (www.Clinical-Trials.gov) uma exigência para todos os estudos de ensaios clínicos aceitos para publicação no Pediatric Research . Clínica número de registro do ensaio deve estar disponível, e observou no texto, antes da aceitação para publicação.

Manuscrito de organização e preparação

O texto manuscrito deverão ser numeradas e montadas na seguinte ordem: página de rosto do manuscrito, abstract, as abreviações, as referências, e as tabelas, figura. Cada seção do manuscrito deve começar em uma nova página. As tabelas e figuras devem ser apresentados em arquivos separados.

Capa do Manuscrito. A página de rosto do manuscrito deve conter as seguintes informações:

Título: O título deve ser conciso e descritivo. Estudos realizados com modelos animais devem ser evidente a partir do título.

Título corrido: A execução de título curto, não superior a 40 caracteres, incluindo espaços, devem ser fornecidos para a página de título.

Lista dos autores: A lista completa e ordenada dos autores: nome, no meio) inicial (s, e sobrenome. O autor correspondente deverá ser claramente sinalizados com um asterisco.

Afiliações Institucional de autor: O nome do departamento, instituição, estado, cidade ou província, país e código postal de cada autor deve aparecer na página de rosto do manuscrito.

Endereço para correspondência: Informações correspondentes do autor devem incluir o completo endereço para correspondência, telefone, fax e endereço de correio electrónico. O crédito de autoria exige contribuição substancial à concepção e desenho, análise e interpretação de dados e contribuição intelectual importante na elaboração ou revisão do manuscrito.

Declaração de apoio financeiro: Reconhecimento de apoio financeiro a partir de fontes extra-muros (por exemplo, das bolsas, da indústria, governo) devem ser incluídos. Se não houver apoio financeiro foi recebido em apoio ao estudo, por favor inclua uma menção a esse fato na capa do manuscrito.

Categoria de estudo: O manuscrito deve ser identificada como 1 a) a ciência básica, 2) de translação, 3) pré-clínica, ou 4) estudo clínico.

Contagem de palavras do resumo: A contagem da palavra deve incluir um texto de resumo somente.

Contagem de palavras do manuscrito: A contagem da palavra deve incluir abreviaturas, resumo, texto manuscrito, referências e legendas.

Resumo. Um resumo de no máximo 200 palavras, deve ser fornecido. O resumo deve descrever brevemente o problema a ser enfrentado, a hipótese, como o estudo foi realizado, as principais conclusões, e uma interpretação dos resultados. Estatística e detalhes metodológicos que podem ser encontrados no documento não devem ser incluídos no resumo.

Abreviaturas. Uma série de abreviaturas padrão estão listados no apêndice. abreviaturas não usuais usados pelo menos três vezes no manuscrito devem ser definidos imediatamente após a primeira vez que usou e na lista de abreviaturas. Abreviaturas utilizadas somente em tabelas ou figuras podem ser definidos nas legendas. Para as enzimas, incluir o número do CE, caso tenha sido atribuído.

Introdução. A introdução deve ser sucinta, orientando o leitor para o estado do conhecimento na área específica em investigação e delinear claramente as questões e hipóteses da pesquisa.

Métodos. Método deve ser descrito e referenciado em detalhes suficientes para outros pesquisadores possam repetir o trabalho. Para maior clareza, é frequentemente útil métodos subdividir em seções como indivíduos, as medições de protocolo e análise dos dados. Sugere-se que uma análise estatística de análise de dados complexos. Fabricante, o nome e o local ou uma URL deve ser dada para os produtos químicos incomuns, reagentes e peças especiais de aparelhos. Celsius, embora não seja uma unidade SI, devem ser utilizados para a temperatura do corpo ou para a medição de laboratório temperaturas na faixa fisiológica. Resultados das unidades SI podem ser encontradas em Lundberg GS, C Iverson, Radulescu G JAMA 1986 255:2329; jovem DS 1987 Ann Intern Med 106:114 -129; CH, Vigoureux P, Eds. Page, NBS Publicação Especial 330 (Washington DC : EUA Government Printing Office) e no Manual de IUPAC de Terminologia e símbolos para quantidades Physiochemical e Unidades (Elmsford, NY: Imprensa Pergamon, 1979).

Resultados. Os dados experimentais devem ser apresentados na forma mais adequada: apresentar os mesmos dados em gráficos e forma de tabela é desencorajado. Quando possível, é desejável para apresentar dados de forma gráfica.

Discussão. A sessão de discussão deverá centrar-se sobre as implicações dos resultados e as limitações do estudo. Deve relacionar os resultados com outros estudos relevantes.

Agradecimentos. Reconhecimento da assistência técnica, consultoria críticas ou outro tipo de assistência deve ser colocado após a discussão, mas antes das referências.

Referências. Referências à literatura devem ser citados em ordem numérica (entre parênteses) no texto. As referências devem ser digitadas em espaço duplo início em folha separada e

devem ser numeradas na ordem em que aparecem no texto. Se um artigo citado nas referências está na imprensa, o artigo de imprensa deve acompanhar o documento apresentado como um documento de apoio. Manuscritos em preparação, observações não publicadas e comunicações pessoais devem ser citados como tal no texto e não incluídas na lista de referência. Os resumos não são aceitos como referências bibliográficas.

Estilo de referências -

Referências de artigos em revistas devem ser dados na seguinte ordem: os nomes de todos os autores com as iniciais (não utilizar et al.), ano, título do trabalho, com apenas a letra inicial da palavra inicial e nomes próprios em maiúsculas, o nome abreviado do jornal sem pontuação de acordo com o estilo usado no Index Medicus , seguido do número e volume e último da primeira página do artigo. Por exemplo: Gomez RA, Meernik JG, Kuehl WD, Robillard JE 1984 Aspectos sobre desenvolvimento de resposta renal a hemorragia durante a vida fetal. *Pediatr Res* 18:40-46

Livros. Give 'sobrenomes dos autores iniciais (s), ano, título do livro, editora, cidade da publicação e páginas inclusiva. Por exemplo: Berna RW, Levy MN 1981 *Fisiologia Cardiovascular*. CV Mosby Co, St. Louis, pp 252-260

Capítulos capítulos em livros são os seguintes: Seegmillere JE 1983 Distúrbios do metabolismo de purina e pirimidina. In: AH Emery, Rimoin DL (eds) *Princípios e Práticas de Genética Médica*. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp 1286-1305

As legendas das figuras. legendas devem ser digitadas em espaço duplo em uma página separada e não na figura. Elas devem ser numeradas (1, 2, 3, etc) e ter um título. painéis individuais em figuras compostas devem ser rotulados A, B, C, etc, e identificadas na legenda. A legenda deve incluir detalhes suficientes para fazer a figura inteligível sem referência ao texto. Figura painel de títulos /, chaves figura, ampliação e informações estatísticas ("n" por grupo, e "p") deve ser colocado na legenda e não na figura.

Tabelas. As tabelas devem ser apresentadas sob a forma de espaço duplo cópia dactilografada, uma tabela por página. Elas devem ser numeradas (1, 2, 3, etc) e ter um título. Cada tabela deve ser inteligível sem referência ao texto. Cuidados devem ser tomados para minimizar ou repetitivo entradas redundantes de uma tabela. Por exemplo, ao invés de afirmar "_ p <0,05" para cada uma das 20 comparações dentro de uma tabela, basta usar um símbolo especial definido em uma nota de rodapé para indicar níveis de probabilidade especificada. notas de rodapé de tabelas devem ser colocados na mesma página que a tabela, imediatamente

após ele. Os símbolos especiais para ser usado para as tabelas são as seguintes: *, **, †, ‡, §, _ ¶.

Figuras. A arte deve ser criada / digitalizados e enviados como um EPS TIFF ou arquivo do PowerPoint. Imagens coloridas devem ser criados / digitalizada, salvos e apresentados como arquivos CMYK. As figuras devem ser numeradas de acordo com a ordem em que são citadas no texto. Submissões do manuscrito deve incluir um conjunto completo de todos os valores devidamente numerados e enviados em arquivos separados do texto manuscrito. As figuras devem ser construídos de uma forma clara e organizada, com letras grandes o suficiente para permitir a redução do tamanho de uma única coluna (9 cm ou 3,5 cm). Se as fontes são utilizadas na obra, devem ser convertidos em caminhos ou linhas, ou devem ser incorporadas nos arquivos. Composite ou longo figuras horizontal pode, às vezes, ocupam duas colunas. Todos os painéis de uma figura composta devem ser colocados juntos na mesma página e apresentado como uma figura. Se os componentes (por exemplo, A, B, C) de uma figura composta devem ser referidos no texto lenda ou figura, a figura deve conter a carta de identificação. / Painel de títulos das figuras devem ser fornecidos na legenda e não na figura. As figuras podem ser apresentadas em qualquer um dos seguintes formatos:

Desenhos a linha deve estar preparado para minimizar o espaço necessário para sua reprodução. gráficos de linha devem incluir informações estatísticas adequadas (barras de erro), e "p" deve ser indicado com os símbolos aprovado (*, **, †, ‡, §, _ ¶). A linha de arte deve ter uma resolução de pelo menos 1200 dpi (pontos por polegada).

Electronic fotografias de radiografias, fotomicrografias ou eletromicrografias, tomografia, etc, e digitalizadas as imagens devem ter resolução mínima de 300 dpi. Gel ou meios-tons devem mostrar apenas as áreas mais pertinentes para evitar a redução no tamanho. Uma barra de escala micron devem ser previstos na fotomicrografia. As fotografias de "caras pacientes devem ser incluídos apenas se cientificamente relevantes. Os autores devem obter autorização escrita para a utilização de tais fotografias. Toda a arte eletrônica que não pode ser carregado com sucesso deve ser apresentado em uma de 3 polegadas de alta densidade do disco-1/2, um CD-ROM, acompanhado de laser de alta resolução de impressão de cada imagem.

Encargos

Pediatric Research não cobra uma taxa de apresentação do manuscrito para a revisão dos manuscritos. Os manuscritos aceitos para publicação será avaliada uma taxa de US \$ 70 página por página. Uma taxa adicional será avaliado para a reprodução de impressão de figuras coloridas. Uma citação de custos dos encargos da página e da oferta de compra eprints

e / ou reproduções serão enviadas a partir do editor antes da publicação do manuscrito. Todos os custos de publicação são de responsabilidade dos autores e da editora irá faturar autores por esses encargos.

Capa

Ilustrações da capa podem ser escolhidas a cada mês a partir de um artigo publicado na revista. Os autores são encorajados a fazer sugestões em sua carta referindo-se a números específicos em seu manuscrito com acompanhamento de legendas, no momento da apresentação do seu papel. As figuras serão publicadas na capa sem acusação formal.

Atualizado em março 2008

Apêndice

Abreviaturas usadas normalmente Aprovado

Unidades de Medidas Standard / Quantidades / Allied Terms

Abreviatura ou símbolo	Prazo
-------------------------------	--------------

A	ampère
Å	angstrom
ATM	atmosfera padrão
pb	pares de base
Bq	bacquerel
C	coulomb
° C	Graus Celsius
cal	caloria
Ci	curie
centímetros ²	centímetro quadrado
cpm	contagens por minuto
cps	contagens por segundo
d	dia
D	Dalton
dpm	desintegrações por minuto
dps	desintegrações por segundo
Eq.	equivalente

eV	elétron-volt
F	Farad
g	grama
G	gauss
Gy	cinzento
h	hora
ht	altura
Hz	hertz
UI	unidade internacional
J	joule
K	kelvin
k _d	constante de dissociação
k _i	constante de inibição
K _m	Constante de Michaelis
l	litro
log	logaritmo comum
ln	logaritmo natural
m	metro
M	molar
M _r	peso molecular
min	minuto
mo	Mês
mol	toupeira
N	newton
N	concentração normal
OD	densidade óptica
osmol	osmol
Pa	pascal
P _{CO₂}	pressão de CO ₂
P _{O₂}	pressão de O ₂
pH	logaritmo negativo de hidrogênio
íon	atividade
pI	ponto isoelétrico
rad	radiação (ionizante, a dose absorvida)

rpm	rotações por minuto
s	segunda
sp ato	atividade específica
gr sp	gravidade específica
São Tomé e Príncipe	condições normais de temperatura e pressão
Sv	sievert
$t_{1/2}$	meia-vida
V	volt
V max	velocidade máxima
vol	volume
W	watt
wk	semana
y	ano

A combinação de prefixos

T	tera (10 ¹²)
G	giga-(10 ⁹)
M	mega-(10 ⁶)
k	quilo (10 ³)
h	hectolitro (10 ²)
da	deka (10 ¹)
d	deci-(10 ⁻¹)
c	centi (10 ⁻²)
m	mili-(10 ⁻³)
μ	micro-(10 ⁻⁶)
n	nanométrica (10 ⁻⁹)
p	pico (10 ⁻¹²)
f	femto (10 ⁻¹⁵)
um	atto (10 ⁻¹⁸)

Termos de Estatística

ANOVA	análise de variância
CI	intervalo de confiança
df	graus de liberdade

F	razão de variância
LOD	log das probabilidades
n	número de observações
NS	não significativo
OU	odds ratio
p	probabilidade
r	coeficiente de correlação
SD	desvio-padrão
SEM	erro padrão da média
t teste	Student's t teste

Termos Biológicos e Químicos

ACTH	adrenocorticotropin
AMP, ADP, ATP	59 adenosina mono-, di e trifosfato
AMPA	ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionic
apo	apolipoproteína
ATPase	adenosina trifosfatase
AVP	arginina-vasopressina
BSA	albumina de soro bovino
AMPc (BPF)	AMP cíclico (GMP)
cDNA	DNA complementar
CNS	sistema nervoso central
CoA	coenzima A
DA	Canal arterial
DMEM	essentialmedium modificado Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico (deoxyribonucleate)
TDT	ditiotreitól
DZ	dizigóticos
EBV	O vírus de Epstein-Barr
EDTA	etilenodiaminotetracetato
EGF	fator de crescimento epidérmico
EGTA	etilenoglicol-bis (b aminoethylether) - N, N9 tetraacetic ácido
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay

FCS	soro fetal bovino
FFA	ácidos graxos livres
FISH	fluorescência in situ da hibridação
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FSH	hormônio folículo estimulante
GABA	ácido gama-aminobutírico
TFG	taxa de filtração glomerular
GH	hormônio de crescimento
GMP	guanosina monofosfato de 5'
Hb	hemoglobina
HDL (C)	lipoproteína de alta densidade (o colesterol)
HEPES	N -2-hydroxyethylpiperazine- N9-2 -ácido ethanesufonic
HLA	antígeno leucocitário humano de histocompatibilidade
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
HZ	heterozigótica
ICAM	molécula de adesão intracelular
IFN	interferon
Ig	imunoglobulina
IGF-I (II)	insulina como fator de crescimento I ou II
IL	interleucina
KO	knock-out
LDL (C)	lipoproteína de baixa densidade (o colesterol)
LH	hormônio luteinizante
m (r) (t) de RNA	mensageiro (ribossômico) (de transferência) RNA
MAb	anticorpo monoclonal
MZ	monozigóticos
NAD, NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo, formas oxidada e reduzida
NADP, NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo, formas oxidada e reduzida
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	tampão fosfato

PCR	reação em cadeia da polimerase
PDGF	platlet fator de crescimento derivado
PKC	proteína quinase C
PTH	hormônio da paratireóide
RFLP	polimorfismo do comprimento do fragmento
RIA	radioimunoensaio
RNA	ácido ribonucléico
RNAi	A interferência do RNA
RTK	receptor tirosina quinase
RT-PCR	transcriptase reversa PCR
SDS	dodecil sulfato de sódio
siRNA	pequenas interferring RNA
snRPS	Pequenas partículas nucleares RNA
TGF	fator transformador de crescimento
TNF	fator de necrose tumoral
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TSH	tirotropina
TUNEL	deoxynucleotidyl terminal transferase nick fim de rotulagem
UV	ultravioleta
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VLDL (C)	lipoproteínas de baixa densidade (o colesterol)
WT	tipo selvagem

Termos Médicos e Farmacológicos

AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
IMC	índice de massa corporal
CP	paralisia cerebral
ECG	eletrocardiograma
ED50	50% da dose eficaz
EEG	eletroencefalograma
GA	idade gestacional
HIV	vírus da imunodeficiência humana
im	intramuscular
ip	intraperitoneal

iv	intravenosa
RCIU	restrição de crescimento intra-uterino
BPN	baixo peso ao nascer
DL50	50% dose letal
RM	ressonância magnética
UTIN	unidade de terapia intensiva neonatal
po	pela boca
PET	A tomografia por emissão de pósitrons
PNS	sistema nervoso periférico
RDS	síndrome do desconforto respiratório
RQ	quociente respiratório
sc	subcutâneo
SID (S)	morte súbita infantil (síndrome)

Anexo III

EFFECTS OF SECOND-HAND SMOKING ASSOCIATED WITH PHYSICAL EXERCISE IN THE SKELETAL MUSCLES OF RATS DURING PREGNANCY AND LACTATION

B.C.G. Valsoni¹, M. R. Bonfim¹, F.Y. Kodama¹, R.C.T. Camargo¹, J.C.S. Camargo Filho¹

¹Laboratório de Histologia, Departamento de Fisioterapia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (FCT/UNESP), Presidente Prudente, SP, Brasil.

Short title: Second-hand smoking and exercise in pregnancy and lactation

Key words: Second-hand Smoking, Physical Exercise, Pregnancy, Lactation, Skeletal Muscle, Histology.

Financed by: CAPES

Address for correspondence:

J.C.S. Camargo Filho, Departamento de Fisioterapia, FCT / UNESP, Rua Roberto Simonsen, 305, 19060-900 Presidente Prudente, SP, Brasil.

Fax: (18) 3229-5353

E-mail: camargo@fct.unesp.br

Abstract

The objective of this study was to analyze the effects of second-hand smoking, in soleus and gastrocnemius muscles associated with physical exercise by swimming during pregnancy and lactation of rats. Twenty-four rats were divided: GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (underwent to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (underwent to the swimming program). On the first day of pregnancy procedure of exposure to cigarette smoke began, consisting in 30 minutes twice a day for six weeks. During the same period the swimming program began, which lasted 60 minutes every day until the 21st day of lactation. Soleus and gastrocnemius muscles, were obtained for histological, histochemical, morphometric analysis and fiber profiling. In histology, the groups GF and GFN showed infiltrations, necrotic and phagocytized fibers, centralized nuclei, splittings and coiling; in GN changes were observed due to exercise adaptations, infiltrations, sarcolemal lesion, polymorphic, atrophic and angular fibers. In the histochemical analysis of the groups GF and GFN there was not enzymatic activity and amorphous formazan aggregates in subsarcolemmal positions, however in GN the same changes were found in lower frequency and intensity. In regard to the measure of the cross-section of muscle fibers there weren't significant differences among the groups, as well as, in the frequency of types of fibers of the gastrocnemius. It is concluded that exercise intensified the morphological and histochemical changes caused by nicotine but it did not influence the measurement of the smaller diameter of muscle fibers, nor the types of fibers.

Introduction

Second-hand smoking is characterized by inhalation of side-stream smoke, produced by the slow-burning ends of cigarettes between puffs, as well as, by inhalation of mainstream smoke exhaled by smokers (1). Side-stream smoke is a complex mixture composed of more than 5000 chemical compounds, which shows concentrations ten times higher than the nicotine, tar and carbon monoxide in smoke inhaled by active smokers. However, a passive smoker inhales fewer cigarette components, still harmful, due to the progressive dilution of smoke in the air (2).

When the passive smoker is a pregnant woman, the losses go farther, because exposure to cigarette smoke is a substantial cause of fetal morbidity and mortality (3), as well as the responsible factor for delaying the development of infants (4). In the last years, several studies have reported only the consequences of maternal passive smoking to the fetus and newborns (4 - 6), but little is known about the consequences to the mother.

During pregnancy women seek for a healthier lifestyle with more balanced diets and physical exercise, because it improves the cardiorespiratory condition, controls weight gain (7), and besides, prevents diseases such as: hypertension, diabetes, postpartum obesity (8).

Within the skeletal muscle realm, the benefits of physical exercise are: to alleviate leg cramps and muscle fatigue, to improve agility and ability to perform daily activities, to alleviate and to prevent backaches caused by the increase in lumbar curvature (7, 8).

On the other hand, it is known that physical exercise is also associated with the occurrence of adaptations in skeletal muscles, which include alterations in metabolic and structural characteristics, also leading to the onset of inflammation caused by micro lesions (9).

Studies (10, 11) relate data from pathological examinations, as instances of inflammation in segments of muscle fibers with smoking, justified by the fact that nicotine

induces oxidative stress, which produces free radicals, and those attack the lipid layer of cell membranes. Cigarette smoke also induces changes in the properties of muscle fibers, especially in highly oxidative fibers, thereby reducing the number of type I fibers and increasing the type IIb fibers (12).

From the inflammatory effects of skeletal muscles, as a result from the nicotine contained in cigarette smoke as a risk factor for pregnant women indoors, and the beneficial effects provided by exercise, which has been widely sought by women during the pregnancy and breastfeeding, it stages intends to investigate the protective effects of exercise on skeletal muscle.

Thus, the objective of this study was to analyze the effects of passive smoking, associated with physical exercise by swimming in the soleus and gastrocnemius muscles during pregnancy and lactation of rats.

Material and Methods

The experimental procedure was approved by the Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP – Campus de Presidente Prudente, process number 24/2009, which followed the "Princípios Éticos na Experimentação Animal" adopted by the Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Animals and experimental design

For this experiment twenty-four 3-month-old female virgin Wistar rats and eight male Wistar rats (*Rattus norvegicus*, var. Albina, Rodentia, Mammalia) were kept in individual cages at a temperature of 22 ± 2 ° C, with humidity at $50 \pm 10\%$, with 12 hours light / dark cycle (7 AM – 7 PM) and free access to water and standard pellets Primor®.

To standardize the groups, the 24 female virgin rats underwent a vaginal smear to check the phase of the estrous cycle and then allocated by the proximity of the stages into four

groups of six animals each: GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (submitted to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (submitted to the swimming program). The phase of the estrous cycle (proestrus, estrus, metestrus and diestrus) was determined by analysis of cellular vaginal, performed by a daily smear between 13 and 15 hours.

The verification of the estrous cycle was performed for more than a week after the division of groups and when the fertile phase (estrus) was detected, the rats were placed in individual cages with a male rat, where they remained overnight for copulation. The next morning, pregnancy was diagnosed by the presence of sperm in the vaginal smear, which marked day zero of pregnancy (5).

Protocol of exposure to cigarette smoke

On the first day of pregnancy the protocol of exposure to cigarette smoke was initiated, which was divided into two phases: first, the adaptation phase, comprising the first five days, where the animals in the groups GF and GFN were exposed to cigarette smoke in the smoke chamber at a temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (13) for 10 minutes a day, 250 ppm (parts per million) of CO (carbon monoxide) measured by Biosystems TxiPro® specific gas detector. The second phase or experimental phase started to last 30 minutes twice a day (morning and afternoon), six days a week with 350 ppm CO of exposure (14).

The animals in GC and GN were submitted to inhalation of compressed air with the same characteristics of time and frequency as the animals exposed to smoke.

For the fulfillment of this protocol two hermetically sealed chambers were used, one for groups GF and GFN with inhalation of cigarette smoke and the second for the animals of groups GC and GN with inhalation of only compressed air. The chamber for smoke inhalation was divided into two compartments, one for placement of lit cigarettes, and another one for

the viewing of the cage with six animals, adapted according to the inhalation system described by Cendon Filha (15).

Commercially purchased cigarettes were used, comprised of: a mixture of smoke, sugar, cigarette paper, plant extracts and flavoring agents, that produced in each burning: 10mg tar, 0.9 mg nicotine and 10mg carbon monoxide, as stated on the product package.

Protocol of the swimming program

The swimming program started on the first day of pregnancy, as reported by Volpato et al. (16), in a tank at 30°C and water 40 cm deep, in order not to allow the rat's tails of reaching the tank bottom, thus incentivizing them to swim.

This program was divided into two phases: the first, phase of training adaptation, characterized by the first five sessions of swimming with a gradual increase of 10 minutes duration per day, starting with 20 minutes and getting at the fifth session of 60 minutes. The second training phase was initiated at the sixth session and kept the duration of 60 minutes until the 36th session. The swimming sessions were daily, without interruption, in the morning, six days a week for six weeks. In the case of GFN, it was after exposure to cigarette smoke.

The animals in groups GF and GC were submitted to the same conditions of the swimming program, however with water 10 cm deep per 15 minutes, to endure the same stress, but it avoiding physical training through swimming.

Both the protocol of exposure to cigarette smoke, and the swimming program ended on the 21st day of lactation.

Material collect

The twenty-four female rats were weighed before copulation and on the day of the euthanasia, which was by guillotine on the 21st day of lactation. After their sacrifice, the surgery for the removal of the gastrocnemius and soleus muscles of the left pelvic limb

started, which were weighed. A sample of the gastrocnemius muscle was obtained by a cross section near its origin, specifically in the medial head of the respective muscle.

Histological analysis

The fragments of the muscles were frozen by the freezing method of non-fixed tissue and stored in cryogenic nitrogen to -180°C . From the fragments frozen slides were obtained with cross sections of $6\mu\text{m}$ at -20°C , which were then stained with Hematoxylin and Eosin (HE) method for qualitative evaluation of the following characteristics of the soleus and gastrocnemius muscles: shape, size, position of nuclei, phagocytosis, increased endomysial and perimysial and splitting, using Jenapol Zeiss optical microscope (Carl Zeiss ®) (17, 18). Quantitative analysis of morphological characteristics described above was made from the frequency analysis, where the presence or absence of these characteristics was detected in the slides of each animal (19).

Histochemistry analysis

To demonstrate the activity of oxidative-glycolytic muscle fiber types, other slides were prepared with the method of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Tetrazolium Reductase (NADH-TR), which evaluated the level of formazan in the sarcoplasm of muscle fibers of the slides, using the technique Pearse modified by Dubowitz and Brooke (20). By the same method the typing of muscle fibers was carried out, with fibers type I and II in gastrocnemius muscle (21), and later the frequency of types of fiber was verified.

Muscle fiber cross-section area

The possible variations in the size of muscle fibers of the soleus and gastrocnemius muscles were measured through a system of computerized image analysis (NIS-Elements D3.0 - SP7 - Nikon ®) of the slides prepared by the method of NADH-TR. In each image with 100x increase muscle fiber cross-section area (μm) in the central region of the section was measured, adapted according to Dubowitz & Brooke (20).

Statistical analysis

For data analysis the SPSS 17.0 software was used, the test Komolgorov-Smirnov was applied, as it was normal, a statistical presentation of mean values followed by their standard deviations was used, and confidence interval (95%). One-Way ANOVA was used to identify possible differences among groups, when differences were observed, the Tukey test was applied. The T-test was applied to compare the values of initial and final weight of rats. For all tests, the level of significance was set at 5%.

Results

Body Weight

The comparison of the weight of virgin female rats before copulation showed no statistically significant difference among the different groups ($p = 0.734$). At the end of the lactation period, the rats were weighed again and there was no significant difference among the experimental and control groups ($p = 0.580$). Comparing the values of initial and final weight, there was a significant difference for the GC ($p = 0.002$), GFN ($p = 0.001$) and GN ($p = 0.040$), and only GF did not show significant difference ($p = 0.108$).

INSERT TABLE 1

Muscle weight

The analysis comparing the weight of the gastrocnemius and soleus muscles among the different groups showed no significant difference, for both muscles: soleus ($p = 0.9283$) and gastrocnemius ($p = 0.3610$) among experimental and control groups, as table 1 shows.

Muscle Histology

The qualitative analysis of the soleus muscle slides indicated that the GF showed inflammations, increased endomysial and perimysial tissue, necrotic and phagocytized fibers, over 10% of centralized nuclei, many polymorphic and rounded fibers, and various splittings

and coiled . The GC showed normal morphology, fascicular pattern, mostly polygonal fibers with some polymorphic and atrophic fibers. In the group exposed to cigarette smoke and submitted to the swimming program (GFN) showed changes in the fibers, for example: rounded fibers, in the process of phagocytosis and splittings, and large extent of inflammations. The rats of group GN showed an increase in endomysium and perimysium, angular and atrophic fibers, few splitting, inflammations and sarcolemal lesion (Figure 1).

INSERT FIGURE 1

Qualitative analysis of the gastrocnemius muscle revealed changes in the shape of muscle fibers of the group GF as atrophic, hypertrophic, polymorphic, rounded and angular fibers, it was also observed increase of endomysial and perimysial tissue, and fibers in the process of phagocytosis and necrosis. In the group GC fibers with polygonal shape, peripheral nuclei and fascicular pattern were found. The histological changes found in the GFN were increase of endomysial and perimysial connective tissue with inflammation, atrophic and polymorphic fibers, and several fibers phagocytized. In the group only exercised (GN), the analysis of the slides indicated that the rats had changes characterized by increase of the endomysial and perimysial tissue with inflammation and injury sarcolemal, and changes in the muscle fibers, like polymorphic, atrophic and angular fibers (Figure 1).

Table 2 shows the result of quantitative analysis of histological changes observed in the fibers of soleus and gastrocnemius muscles of rats in each group. The results show that animals of the GFN had the highest frequency of occurrence of histological changes in soleus and gastrocnemius muscles. In animals of the GN group, changes more related to the shape of the fibers were found.

INSERT TABLE 2

Muscular Histochemistry

The analysis of the soleus muscle slides with reaction of NADH-TR GF indicated loss of enzymatic activity in some fibers, both in the central area and in the periphery of the fiber. In the GC group there was a normal pattern of reaction for most fibers. The GFN group had irregular distribution of reaction for most of the fibers, there were some fibers with loss of reaction, and others had increase of enzyme activity with the presence of formazan aggregates in subsarcolemmal position. The GN group showed in some fibers weak reactive activity in the central and subsarcolemmal area, but also amorphous formazan aggregates in subsarcolemmal position, showing the position of the mitochondria (Figure 2).

INSERT FIGURE 2

Regarding to the histochemical analysis of the gastrocnemius muscle, in the GF group no activity was found in various fibers and other fibers with amorphous formazan aggregates in the subsarcolemmal and central area, mostly in oxidative fibers. In the control group (GC) standard reaction for most fibers was observed, with a few of them with increase of enzyme activity in subsarcolemmal position. The GFN group had irregular pattern of distribution of the NADH-TR reaction with many fibers showing weak reactive activity in the periphery. In the GN group there was loss of reaction in a few fibers and in other fibers there was presence of formazan in subsarcolemmal position (Figure 2).

Muscle fiber cross-section area

The analysis of variance showed no difference in the values of soleus muscle fiber cross-section area ($p = 0.2472$), such as in type I fibers of the gastrocnemius muscle ($p = 0.6669$) and type II fibers ($p = 0.6053$) among groups, as observed in Table 3.

INSERT TABLE 3

Typing of muscle fibers

After checking the frequency of types of fibers of the gastrocnemius muscle, it was observed that there was no statistically significant difference in the number of type I fibers (p

= 0.5487) and type II ($p = 0.4734$) among the studied groups. The frequencies that were found of types of fiber for the groups are shown in Table 4.

INSERT TABLE 4

Discussion

In this study it was found that the body weight of rats increased from the period prior to copulation to the twenty-first days of lactation, but for the GF group this weight gain was not significant, this lack of weight gain could be explained by the appetite inhibitory effect caused by nicotine contained in side-stream smoke (22). Moreover, there was no difference between groups in initial weight, showing homogeneity before the beginning of protocols.

Our finding, regarding the weight of the rats, corroborates those of Mello et al. (5). When considering the influence of exposure to cigarette smoke on weight gain of pregnant rats, they concluded that exposure to tobacco reduced their weight gain, but part of this effect was due to the stress of manipulation.

There was no significant difference among groups in the weight in the gastrocnemius and soleus muscles. It infers that muscle overload imposed by pregnancy was insufficient to promote volume increase and muscle hypertrophy, as well as the period of exposure to cigarette smoke was insufficient to reduce the muscle mass of rats. A similar phenomenon was observed by Nakatani et al. (23) when evaluating Wistar-Kyoto rats for eight weeks with different doses of inhalation of cigarette smoke and they found that there was no difference in muscle weight of the control group, regardless of dosage exposure.

In general, the main data of this study is related to the histology and histochemistry of the soleus and gastrocnemius muscles, whereas in both muscles there were higher incidences of change in the groups exposed to cigarette smoke. Changes such as: inflammatory infiltrates, increase of endomysial and perimysial tissue, necrotic and phagocytized fibers,

more than 10% of centralized nuclei, several polymorphic, atrophic and rounded fibers, and many splittings and curled, reflecting muscle injury in the groups exposed to cigarette smoke.

One of the factors to justify muscle injury in groups exposed to cigarette smoke may be related to the effect of the nicotine contained in cigarette smoke, which promotes vasoconstriction, and releases catecholamines in maternal blood circulation, leading to tecidual hypoxia (4, 23). Another relevant fact is related to increase of carboxyhemoglobin (COHb) in blood, which also decreases tecidual oxygenation (23). Thus, muscle fibers of rats in response to possible low oxygen supply may suffer some changes such as atrophy and phagocytosis (20).

Nicotine also induces the oxidative stress system causing an imbalance in oxidant/antioxidant in cells, which produces reactive oxygen species that attack lipid membranes. The pro-inflammatory cytokines, especially TNF- α (tumor necrosis factor) are responsible for aggression to the cell membrane, thus high concentrations of TNF- α are associated to muscles injuries (10, 24).

As for the histochemical data, irregular distribution of the product was observed in groups GF and GFN, with no reaction in many regions of fibers, showing a decrease in tissue oxygenation, and the fact that higher frequency observed in the soleus and oxidative gastrocnemius muscle fibers of GFN group. The results of this study were to confirm previous studies in both animals (23, 25), and human beings (11), where they found a decrease in muscle oxidative capacity.

The rats that only performed physical exercise during pregnancy and lactation also showed changes in histology and histochemistry of soleus and gastrocnemius muscles, although they showed less frequency and intensity. These changes are normal adaptations of skeletal muscles against the exercise, such as alterations in metabolic and structural

characteristics, as well as inflammatory processes from micro lesions (26); on the other hand the mitochondrial alterations observed in this group were due to increased metabolic demand.

The histological and histochemical results obtained in the group exposed to cigarette smoke and submitted to the swimming program (GFN) showed great similarity to the results obtained in the group only exposed to cigarette smoke (GF), however, the GFN had a higher frequency and intensity, thus showing that physical exercise intensified the changes on the muscle fibers of animals exposed to nicotine effects, by somatization of stress.

It is known that the physiological demand increased due to physical exercise, and it is related to changes in the number and size of muscle fibers, which are adaptations suffered by the muscle to an overload, thus leading to muscle hypertrophy (27). Thus, it was expected that the rats that performed exercises by swimming with overload imposed by pregnancy had shown muscle hypertrophy.

However, this fact was not observed in soleus and gastrocnemius muscles after six weeks with 60 minutes of daily exercise, because there was no significant difference in the values of muscle fibers cross-section area among groups. Thus, it must be considered that the overload imposed by the weight gain from pregnancy outcome was not enough for the action of overload training needed to provide muscle hypertrophy, on the other hand it allowed an adaptation process to the training system realized by rats.

Face to muscle response induced by exposure to cigarette smoke, Nakatani et al. (25) observed that to have reduction in cross-section area of the soleus muscle of rats higher dosage of cigarette smoke it is necessary, however, there was no significant difference to the control group in low doses. The same datum was reported in another study using the EDL muscle (extensor digitorum longus) to type II fibers (23). In this study there was no reduction in soleus and gastrocnemius muscles fibers cross-section area in groups GF and GFN, although these groups have issued a large number of atrophic fibers. Thus, we can infer that

the dosage or the time used in this study were insufficient to influence muscle fibers size significantly.

In a study with smokers it could be verified that changes in skeletal muscle by biopsy of vastus lateralis muscle, characterized by atrophy of type I fibers and increased activity glicolítica (11). Moreover, in studies of cross-sectional area of the quadriceps by magnetic resonance imaging there was no difference between smokers and non-smokers (28, 29), it showing that there is no consensus still in literature.

The nicotine present in cigarette smoke can induce changes in metabolic properties, especially in oxidative metabolism, reducing the type I fibers and increasing the type IIb (12).

In this study there were no significant differences in gastrocnemius muscle type I and II fibers among the studied groups. This finding corroborates Nakatani et al. (23) that in their analysis of rats EDL muscle, did not find difference on distribution of fiber type, regardless of dosage of cigarette smoke or muscle region. However, another study found lower percentage of type I fibers and more type II fibers in soleus muscle of spontaneously hypertensive rats with high doses of cigarette smoke (25).

Moreover, the body weight of rats had not been evaluated during the entire period between pregnancy and lactation limited this study, because from these data we can infer the proportion of overload imposed by pregnancy. And as a future perspective, this study raises the possibility of immunohistochemical analysis for enumeration of inflammatory cells.

In summary, this study showed that exercise increased the morphological and histochemical changes caused by passive smoking in the skeletal muscle of rats during pregnancy and lactation, but it did not influence the muscle fibers cross-section area, nor the fibers types, as well as passive smoking.

Acknowledgments

We thank the technician of the Laboratory of Histology, FCT / UNESP, Sidney Siqueira Leirião for collaboration in the research development.

References

1. Rogers JM. Tobacco and pregnancy. *Reproductive Toxicology*. 2009; 28:152-160.
2. Brownson RC, Figgs LW, Caisley LE. Epidemiology of environmental Tobacco smoke exposure. *Oncogene*. 2002; 21:7341-7348.
3. Coleman T. Reducing Harm From Tobacco Smoke Exposure During Pregnancy. *Birth Defects Research*. 2008; 84:73-79.
4. Mello PR, Pinto GR, Botelho C. The influence of smoking on fertility, pregnancy and lactation. *J Pediatr*. 2001; 77:257-264.
5. Mello PRB, Okay TS, Botelho C. Influência da exposição à fumaça lateral do cigarro sobre o ganho de peso e o consumo alimentar de ratas gestantes: análise do peso e do comprimento dos filhotes ao nascimento. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2006; 28(3):143-150.
6. Mello PRB, Okay TS, Botelho C. The effects of exposing rats to cigarette smoke on milk production and growth of offspring *Jornal de Pediatria*. 2007; 83(3):267-273.
7. Cavalcante SR, Cecatti JG, Pereira RI, Baciuk EP, Bernardo AL, Silveira C. Water aerobics II: maternal body composition and perinatal outcomes after a program for low risk pregnant women. *Reproductive Health*. 2009; 6(1):1-7.
8. Melzer K, Schutz Y, Boulvain M, Kayser B. Physical activity and pregnancy: cardiovascular adaptations, recommendations and pregnancy outcomes. *Sports Med*. 2010; 40(6):493-507.

9. Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. 2002; 81(11):S40-S51.
10. Chattopadhyay K, Chattopadhyay BD. Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein. *Indian J Med Res*. 2008; 127:571-576.
11. Montes de Oca M, Loeb E, Torres SH, De Sanctis J, Hernández N, Tálamo C. Peripheral muscle alterations in non-COPD smokers. *Chest*. 2008; 131(1):13-18.
12. Larson L, Orlander J, Ansved T, Edstron L. Effects of chronic nicotine exposure on contractile enzyme-histochemical and biochemical properties of fast- and slow-twitch skeletal muscles in the rat. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1998; 134(4):519-527.
13. Czekaj P, Pałasz A, Lebda-Wyborny T, Nowaczyk-Dura G, Karczewska W, Florek E, et al. Morphological changes in lungs, placenta, liver and kidneys of pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Int Arch Occup Environ Health*. 2002; 75:S27-S35.
14. Edirisinghe I, Yang S, Yao H, Rajendrasozhan S, Caito S, Adenuga D, et al. VEGFR-2 inhibition augments cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction. *The FASEB Journal*. 2008; 22:297-310.
15. Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi-Filho G, Dohnnikoff M, Pereira PM, Conceição GMS, et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1997; 30:1241-1247.
16. Volpato GT, Damasceno DC, Campos KE, Rocha R, Rudge MVC, Calderon IMP. Avaliação do efeito do exercício físico no metabolismo de ratas diabéticas prenhes. *Rev Bras Med Esporte*. 2006; 12(5):229-233.

17. Minamoto VB, Grazziano CR, Salvini TF. Effect of single and periodic contusion on the rat soleus muscle at different stages of regeneration. *Anatomical Record*, 1999; 254:281-287.
18. Salvini TF, Morini CC, Selistre de Araújo HS & Ownby CH. Long-term regeneration of fast and slow murine skeletal muscles after induced injury by ACL myotoxin isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) venom. *Anatomical Record*. 1999; 254:521-533.
19. Bonfim MR, Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Padulla SAT, Accioly MF, Souza RSD, Azoubel R. Muscle response to the association of statin and physical exercise in rats. *Int. J. Morphol.* 2009; 27(4):1155-1161.
20. Dubowitz V, Sewry CA. *Muscle biopsy: a practical approach*. 3rd Ed. China: Saunders Elsevier; 2007.
21. Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos GER. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem Cell Biol.* 1999; 111:117–123.
22. Perkins KA, Sexton JE, Dimarco A, Fonte C. Acute effects of tobacco smoking on hunger and eating in male and female smokers. *Appetite*. 1994; 22:149-158.
23. Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Ishihara A. Effects of exposure to cigarette smoke at different dose levels on extensor digitorum longus muscle fibres in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30(9):671-677.
24. De Paepe B, Brusselle GG, Mães T, Creus KK, D'Hose S, D'Haese N, Bracke KR, D'Hulst AI, Joos GF, De Bleecker JL. TNF_α receptor genotype influences smoking-induced muscle-fiber-type shift and atrophy in mice. *Acta Neuropathol.* 2008; 115:675–681.

25. Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Ishihara A. Responses of exposure to cigarette smoke at three dosage levels on soleus muscle fibers in Wistar- Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 2002; 90(2):157-163.
26. Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Camargo RCT, Francischeti FA, Belangero WD, Dal Pai V. Efeitos do esteróide anabólico nandrolona sobre o músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico através de natação: estudo histológico, histoquímico e morfométrico. *Rev Bras Med Esporte* 2006; 12(5):243-248.
27. Hawke TJ. Muscle stem cells and exercise training. *Exercise and Sports Science Reviews* 2005; 33:63-8.
28. Morse CI, Pritchard LJ, Wüst RCI, Jones DA, Degens H. Carbon monoxide inhalation reduces skeletal muscle fatigue resistance. *Acta Physiol* 2008; 192:397-401.
29. Wüst RCI, Morse CI, Haan A, Rittweger J, Jones DA, Degens H. Skeletal muscle properties and fatigue resistance in relation to smoking history. *Eur J Appl Physiol* 2008; 104:103-110.

TABLE 1

Table 1. Mean values followed by their standard deviations of muscular weight (g), initial and final body weight (g) of rats.

GROUPS	INICIAL WEIGHT	FINAL WEIGHT	SOLEUS	GASTROCNEMIUS
GF	229,5 ± 14,0	261,1 ± 38,2	0,127 ± 0,015	1,479 ± 0,120
GC	236,2 ± 12,7*	285,7 ± 30,3	0,129 ± 0,009	1,392 ± 0,094
GFN	227,2 ± 18,8*	281,4 ± 20,5	0,125 ± 0,012	1,398 ± 0,130
GN	231,3 ± 8,2*	275,0 ± 34,0	0,125 ± 0,007	1,355 ± 0,120

GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (underwent to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (underwent to the swimming program). * Significant difference between initial and final weight. $p < 0,05$.

TABLE 2

Table 2. Analysis of frequency (%) of morphological characteristics of soleus and gastrocnemius muscle fibers of each group.

Characteristics	Soleus				Gastrocnemius			
	GF	GC	GFN	GN	GF	GC	GFN	GN
Increased endomysium	50	---	100	80	50	33	83	80
Increased perimysium	67	50	100	100	83	33	83	80
Polymorphic fibers	100	83	100	100	100	100	100	100
Angular fibers	100	83	100	100	100	100	100	100
Rounded fibers	100	50	100	60	83	33	100	100
Atrophic fibers	100	17	100	80	100	33	100	60
Hipertrophic fibers	50	---	67	100	17	---	50	100
Phagocytized fibers	83	17	100	100	100	33	100	60
Necrosed fibers	50	---	100	20	33	---	17	---
Coiled	17	---	---	---	---	---	---	---
Centralized nuclei	33	---	67	20	33	---	67	20
Splittings	100	---	100	40	67	---	83	20
Inflammation	100	33	100	80	100	67	100	80
Injury sarcolemal	100	33	100	100	100	67	100	80

GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (underwent to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (underwent to the swimming program).

FIGURE 1

Figure 1. Soleus muscle fiber cross-section (A- D) and gastrocnemius muscle (E – H) of rats. HE 500 X. A e E) Exposed to cigarette smoke group. B e F) Control group. C e G) Underwent to the swimming program and exposed to cigarette smoke group. D e H) underwent to the swimming program group. TR = triangular fiber, AT = atrophic fiber, AR = rounded fiber, PM = polymorphic fiber, FG = phagocytized fiber, INF = inflammation, NC = necrosed fiber, SP = Splitting, ED = increased endomysium e PE = increased perimysium.

FIGURE 2

Figure 2. Soleus muscle fiber cross-section (A- D) and gastrocnemius muscle (E – H) of rats. NADH-TR 500 X. A e E) Exposed to cigarette smoke group. B e F) Control group. C e G) Underwent to the swimming program and exposed to cigarette smoke group. D e H) underwent to the swimming program group.

TABLE 3

Table 3. Mean values followed by their standard deviations of soleus and gastrocnemius muscle fibers cross-section area (μm) of rats.

Groups	Soleus	Gastrocnemius	
		Type I	Type II
GF	41,80 \pm 3,48	34,37 \pm 2,30	39,89 \pm 3,72
GC	44,34 \pm 3,44	33,48 \pm 2,56	40,15 \pm 3,13
GFN	40,91 \pm 2,37	32,14 \pm 5,00	38,81 \pm 6,75
GN	44,02 \pm 3,84	34,15 \pm 2,58	42,52 \pm 3,41

GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (underwent to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (underwent to the swimming program). $p < 0,05$.

TABLE 4

Table 4. Frequency (%) of types fiber of gastrocnemius muscle of rats.

Groups	Gastrocnemius	
	Type I (%)	Type II (%)
GF	37,37	62,63
GC	37,32	62,68
GFN	29,90	70,01
GN	37,88	62,12

GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (underwent to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (underwent to the swimming program). $p < 0,05$.

Anexo IV

INFLUENCE OF PASSIVE SMOKING ASSOCIATED WITH EXERCISE PERFORMED BY RATS DURING PREGNANCY AND LACTATION ON THE DEVELOPMENT OF THEIR PUPS.

Running Title: Tabagismo passivo durante prenhez e lactação

Bruna C.G. Valsoni¹, Mariana R. Bonfim¹, Fábio Y. Kodama¹, Jacqueline B. Urban¹, Regina C.T. Camargo¹, Luiz Carlos M. Vanderlei¹, José Carlos S. Camargo Filho^{1}*

¹ Departamento de Fisioterapia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (FCT/UNESP), Presidente Prudente, SP, Brasil.

*** Endereço para Correspondência:**

José Carlos S. Camargo Filho

Departamento de Fisioterapia, FCT / UNESP

Rua Roberto Simonsen, 305, 19060-900 Presidente Prudente, SP, Brasil.

Fax: (18) 3229-5353

E-mail: camargo@fct.unesp.br

Apoio financeiro: CAPES

Categoria do estudo: Ciência básica

Abstract

The purpose of this study was to evaluate: mortality, weight and body length, and the gastrocnemius muscle in the offspring of pregnant rats submitted to a swimming program associated with second-hand smoke. Twenty-four rats were divided in four groups: GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (submitted to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (submitted to the swimming program). The mortality, weight and length of the pups were measured at four moments. The gastrocnemius muscle of pups was obtained for evaluation of the muscle development. The average birth late of pups was lower for GF and GFN to the GN and higher. At birth, only the GFN reported measures of weight and length significantly lower; however, during lactation, the groups exposed to cigarette smoke were significantly lower. Groups GF and GFN had delayed muscle development in comparison to GC. In conclusion, passive smoking during pregnancy and lactation negatively influenced number, weight and body length of offspring from birth to weaning and the muscle development, as well the swimming program has positively influenced these variables at birth, however, it has not provided the same benefits during lactation; and the association of those affected these measures negatively.

Introduction

More than one billion people are smokers worldwide, and smoking is the main cause of preventable death, besides this it is responsible for 90% of lung tumors, 75% of chronic bronchitis and 25% of ischemic heart diseases (1). In Brazil, around a third of the adult population is addicted to smoking, with approximately 11.2 million women, mostly of them in the reproductive age, between 20 and 49 years of age (2). This fact is alarming because smoking interferes with the reproductive function of women in the pre-conception stage (3), in the development of pregnancy (4) and during lactation (5).

Maternal smoking causes fetal growth deficit, leading to increased risk of prematurity, miscarriage and low birth weight (6), and this risk is proportionately increased with the number of cigarettes smoked, especially in the last three months of pregnancy (7). On knowing this, the woman tends to stop smoking, to reduce the number of cigarettes smoked, or to quit smoking permanently. However, a lot of pregnant women continue to smoke throughout pregnancy and the period of lactation (8).

It must also be considered, that many women, even while stopping smoking during pregnancy, continue attending indoor environments polluted by tobacco smoke, such as work or leisure environments, schools and other public indoor spaces (9). Still other mothers are exposed to cigarette smoke in their homes by living with a partner who has the habit of smoking, thus, the pregnant woman becomes a passive smoker from inhaling the side-stream smoke (10).

On the other hand, pregnant women seeking exercise to have a healthier lifestyle in order to promote the control of weight gain, since in excess it becomes a major risk factor in pregnancy, leading to the development of pathologies such as hypertension, diabetes, postpartum obesity and others (11).

Besides the benefits that physical exercise provides for pregnant woman, we found it related to greater weight in fetus and newborns (12) as well as the lowest risk of miscarriage, lower rate of premature birth (13) and ceserian section (14).

However, several aspects must be taken into account when prescribing exercise for pregnant women, such as intensity, duration, frequency, pregnancy stage and location for its practice (15), in either soil or water. Exercise performed in water has some advantages because it prevents trauma and skeletal muscle injuries, as well improves peripheral circulation in the extremities (16).

Assuming that physical exercise during pregnancy and lactation promotes benefits for both the mother and the fetus and newborn, and that in contrast passive smoking causes damage to both, as seen studies and publications on trial of humans, it is intended to verify the effects of the association between passive smoking and exercise, because there was no reports of benefits or harms of this association for development of fetus and newborn.

Thus, the experimental model of our study had as an objective to evaluate influence of passive smoking associated with exercise, by means of a swimming program, performed by rats during pregnancy and lactation on weight and length of their offspring at birth and developing postpartum until weaning, as well as on the skeletal muscles and the number of pups per rat.

Methods

The experimental procedure was approved by the Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP – Campus de Presidente Prudente, process number 24/2009, which followed the "Princípios Éticos na Experimentação Animal" adopted by the Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Animals and experimental design

For this experiment twenty-four 3-month-old female virgin Wistar rats and eight male Wistar rats (*Rattus norvegicus*, var. Albina, Rodentia, Mammalia) were kept in individual cages at a temperature of 22 ± 2 ° C, with humidity at $50 \pm 10\%$, with 12 hours light / dark cycle (7 AM – 7 PM) and free access to water and standard pellets Primor®.

To standardize the groups, the 24 female virgin rats underwent a vaginal smear to check the phase of the estrous cycle and then allocated by the proximity of the stages into four groups of six animals each: GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (submitted to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (submitted to the swimming program).

The verification of the estrous cycle was performed for more than a week after the division of groups and when the fertile phase (estrus) was detected, the rats were placed in individual cages with a male rat, where they remained overnight for copulation. The next morning, pregnancy was diagnosed by the presence of sperm in the vaginal smear, which marked day zero of pregnancy (17).

Protocol of exposure to cigarette smoke

On the first day of pregnancy the protocol of exposure to cigarette smoke was initiated, which was divided into two phases: first, the adaptation phase, comprising the first five days, where the animals in the groups GF and GFN were exposed to cigarette smoke in the smoke chamber at a temperature of 23 ± 1 °C (18) for 10 minutes a day, 250 ppm (parts per million) of CO (carbon monoxide) measured by Biosystems TxiPro® specific gas detector. The second phase or experimental phase started to last 30 minutes twice a day (morning and afternoon), six days a week with 350 ppm CO of exposure (19).

The animals in GC and GN were submitted to inhalation of compressed air with the same characteristics of time and frequency as the animals exposed to smoke.

For the fulfillment of this protocol two hermetically sealed chambers were used, one for groups GF and GFN with inhalation of cigarette smoke and the second for the animals of groups GC and GN with inhalation of only compressed air. The chamber for smoke inhalation was divided into two compartments, one for placement of lit cigarettes, and another one for the viewing of the cage with six animals, adapted according to the inhalation system described by Cendon Filha (20).

Commercially purchased cigarettes were used, comprised of: a mixture of smoke, sugar, cigarette paper, plant extracts and flavoring agents, that produced in each burning: 10mg tar, 0.9 mg nicotine and 10mg carbon monoxide, as stated on the product package.

Protocol of the swimming program

The swimming program started on the first day of pregnancy, as reported by Volpato et al. (21), in a tank at 30°C and water 40 cm deep, in order not to allow the rat's tails of reaching the tank bottom, thus incentivizing them to swim.

This program was divided into two phases: the first, phase of training adaptation, characterized by the first five sessions of swimming with a gradual increase of 10 minutes duration per day, starting with 20 minutes and getting at the fifth session of 60 minutes. The second training phase was initiated at the sixth session and kept the duration of 60 minutes until the 36th session. The swimming sessions were daily, without interruption, in the morning, six days a week for six weeks. In the case of GFN, it was after exposure to cigarette smoke.

The animals in groups GF and GC were submitted to the same conditions of the swimming program, however with water 10 cm deep per 15 minutes, to endure the same stress, but it avoiding physical training through swimming.

Both the procedure of exposure to cigarette smoke, as well as the swimming program ended on the 21st day of lactation, a total of 36 of a possible 42 days of treatment between the beginning of pregnancy and the end of lactation, because of rest on Sundays.

Collected data

The rats were weighed before copulation and after 21 days of lactation. We also recorded the number of pups born living or dead, as well as weight and length of newborns in four stages: up to 24 hours after birth (M0), at seven days (M1) and fourteen days (M2) and weaned at 21 days (M3). For weighing the animals, we used an electronic scale ranging from 0.1 g, and a ruler on a flat surface to measure the length of the offspring including both body and tail (17).

On the 21st day of lactation all pups were euthanized by decapitation using a guillotine. After their being put down, we started the surgery for removal of the gastrocnemius muscle from the left pelvic limb, which was weighed next.

The muscles were frozen by the method for freezing non-fixed tissue and stored in cryogenic nitrogen at -180 ° C. Subsequently, slides were obtained with cross sections of 6µm at -20 ° C stained by the Hematoxylin and Eosin (HE) method.

For the verification of possible variations in the size of gastrocnemius muscle fibers, a system of computerized image analysis (NIS-Elements D3.0 - SP7 - Nikon ®) was used. In each image magnified by 100, measurements of muscle fibers cross-section into 120 muscle fibers (mM), were taken, and adjusted according to Dubowitz & Brooke (22).

Statistic analysis

For data analysis we used the SPSS 17.0 software, where the Kolmogorov-Smirnov test was applied to verify its normality. We used the statistical method with descriptive presentation of mean values followed by their standard deviations, and with a confidence interval (95%). One-Way ANOVA was used to identify possible differences among groups,

when differences were observed, the Tukey test was applied. In the nonparametric correlation the Spearman test was used to check the correlation coefficient of the number of pups per rat with the average weight and length of these pups. The T-test was used to compare the initial and final of values weight of the rats. Analysis of variance for repeated measures was applied to evaluate the average weight and length of pups in relation to the moments in each group. For all analysis, the level of significance was 5%.

Results

Body weight of rats

Comparison of weight of the virgin female rats before mating showed no statistically significant difference between the different groups ($p = 0.734$). At the end of lactation, the rats were weighed again and there was no significant difference between the experimental and control groups ($p = 0.580$), as table 1. Comparing the values of initial and final weight, there was a significant difference for the GC ($p = 0.002$), GFN ($p = 0.001$) and GN ($p = 0.040$), only the GF showed no significant difference ($p = 0.108$).

Number of pups

At birth (M0), the group that only did the swimming program (GN) had the highest number of pups and the group only exposed to cigarette smoke (GF) the fewest. After seven days of lactation (M1), there was a reduced number of deaths in groups GF and GFN, and a greater number of deaths for GN could be observed. In the second week of lactation (M2) GN continued to have higher mortality rate, followed by the control group (GC) that had only a few deaths. In the week before weaning (M3) there were no deaths among the pups, as shown in Figure 1. From birth average of rat pups of different groups in this study, there was a decrease in the number of pups from birth until weaning, it being observed a greater percentage of deaths in the GN during this time.

INSERT FIGURE 1

Body weight of pups

Regarding the evolution of the pups body weight in each group, from the average pups body weight of each rat, a significant weight gain was observed along the time for all groups. Comparing the groups at different moments (M0, M1, M2, M3) it had been seen that at birth (M0) the weight of the control group (GC) was significantly higher compared to the group exposed to cigarette smoke and submitted to the swimming program (GFN) ($p = 0.016$). In the first seven days of lactation (M1) there was statistical difference between the GF and GC groups ($p = 0.08$); and GC, and GFN ($p = 0.005$), with body weight of GC higher than the other groups. In the second week of lactation (M2), it was observed that pups from the control group (GC) had a higher body weight than other groups, showing a significant difference between the GF ($p = 0.003$), GFN ($p = 0.003$) and GN ($p = 0.023$). In the last week of lactation (M3) again the GC reported measures of weight higher than GF ($p = 0.032$) and GFN ($p = 0.007$).

In GF group deltas 1 (difference between M0 and M1) and 2 (difference between M1 and M2) were positive and similar, and delta 3 (difference between M2 and M3) was higher than the other deltas. In GC group there was positive deltas over all other groups and the like in the early stages, and the third delta was higher than the others. Deltas of GFN group were also positive with little variation, but the delta between M2 and M3 showed the lowest increase. In the GN group it was noted that delta 1 and 2 were equal and positive, with delta 3 higher than others.

By the Spearman correlation index, there was no positive or negative correlation between body weight and number of pups for GF, GFN and GN groups at different moments, only the GC showed a negative correlation in M3.

INSERT FIGURE 2 AND TABLE 2

Body length of pups

The evolution of the body length of offspring was significant compared to the same moments in all groups. Regarding the difference between the groups at each time, it was observed at birth that only the GFN group had measures significantly lower than the control group ($p = 0.026$) in M1 and once again the GFN group showed measures lower than the CG ($p = 0.017$). In the second week of lactation all groups showed significant difference compared to the GC, like GF ($p = 0.000$), GFN ($p = 0.004$) and GN ($p = 0.027$) had lower measures for body length in pups. In M3, GF ($p = 0.003$) and GFN groups ($p = 0.001$) had a lower average of length than the control group (Figure 2).

With respect to delta of lengths at different moments, there was positive variation in GF group in all deltas, with delta 2 having the smallest increase. The deltas of the GC were positive and higher than other groups, with deltas 1 and 2 being equal. The GFN group also showed delta 1 and 2 equal and positive, and delta 3 lower compared to the others. In the GN group positive deltas was observed, with delta 1 lower than the delta 2, and delta 3 higher than the others.

There was no positive or negative correlation between body length and number of pups according to the Spearman correlation index at different moments in the studied groups.

INSERT TABLE 3

Muscle weight of pups

The analysis comparing the gastrocnemius muscle weight of pups among different groups in the study indicated there was no significant difference only between GF and GFN ($> p 0.05$), as seen Table 4.

INSERT TABLE 4

Muscle morphometry of pups

The variance analysis showed there was statistical difference only in values of gastrocnemius muscle fiber cross-section between the GC and GFN groups ($p = 0.039$), as can be seen in Table 4.

Discussion

In the present study the hypothesis was tested that exercise provides numerous benefits during pregnancy and lactation, should have positive influence on the development of the rat pups when associated with passive smoking. To increase the understanding of second-hand smoke, now, animal models have been used mainly in studies with respect to fetus (23). Based on this principle, the model used in this experiment of exposure to cigarette smoke was based on previous studies (18, 19, 20), in order to reproduce the passive smoking during pregnancy and lactation of rats.

The result in the body weight of rats revealed there was an increase from pre-pregnation to the 21st day of lactation, but the GF group did not have a significant difference between the initial and final weight, which can be justified by the inhibitory effect on the appetite caused by the nicotine contained in cigarettes (24). But the same was not observed in the GFN, possibly due to the effects of exercise. On the other hand, there was no difference among groups in initial weight, demonstrating the homogeneity of the groups before beginning of the experiments. Our findings corroborate those reported by Mello et al. (17), when considering the influence of exposure to side-stream cigarette smoke on weight gain of pregnant rats, they concluded that exposure to tobacco reduced weight gain in rats, and that part of this effect was due to the stress of handling.

Regarding the number of pups per rat, the result showed that at birth the average of the rat pups submitted only to the swimming program was superior to all the studied groups. One hypothesis for this would be the reduced risk of miscarriage, as found in humans, as a benefit

of exercise to improve tissue oxygenation of the mother and consequently of the fetus. Still, with respect to GN, a higher mortality rate was observed over time and it may be explained by the expenditure of energy in the rat during lactation (25).

By contrast, those exposed to the cigarette smoke groups had the lowest average of pups at birth, where it is conjectured the interference of second-hand smoke in pregnancy and may be associated with miscarriage, perinatal deaths and congenital malformations. In fact, premature birth and miscarriage have been verified in human studies, where the pregnant woman is a smoker (26, 27). In this case, the possibility of abortion and stillbirths could have been verified by the number of animals found dead, but because of the fact of rats to eliminate dead pups or ones with congenital changes, we face limitations on further exploration of this topic. Moreover, there was little change in the number of pups during lactation in these groups because there were a reduced number of deaths.

The greatest number of pups per rat observed in GN group may not have been an influencing factor of pup deaths, whereas the Spearman correlation coefficient did not show a significant correlation of the number of pups with the same weight and length at four moments. Only the control group (GC) showed a significant negative correlation at the last moment, which leads us to suppose the influence of interventions during the earlier moments of weight and length of pups.

At birth, those exposed to cigarette smoke and submitted to physical exercise (GFN) showed values of weight and length significantly lower compared to the control group (GC). Similarly, with regard to passive smoking, Mello et. al. (17) observed a reduction in birth weight and length in pups of rats exposed to two cigarettes smoke / animal / day. Besides, the study realized by Ward et. al. (28) with more than 18 000 children in the UK, they have investigated lower birth weights of children whose mothers were exposed to cigarette smoke at home during pregnancy.

A possible hypothesis for the lowest weight and length at birth of the animals exposed to cigarette smoke and submitted to physical exercise is primarily due to the effects of nicotine contained in cigarette smoke, because it releases catecholamines in maternal circulation, leading to malnutrition and chronic fetal hypoxia, by reducing placental blood flow (29). In addition, during pregnancy stressful events result in a decrease in pups size (30), leading to the inference that the stress suffered by the pregnant rat during exercise was added to exposure to cigarette smoke, because the group that only exercised (GN) has not shown significantly lower weight and length.

In subsequent periods depending on lactation, there was an increase in weight and length of pups of all groups, but those exposed to cigarette smoke had smaller measurements compared to the control group (GC). This fact can be explained by the concentration of nicotine in maternal milk (5), because this interferes with lipid accumulation during pregnancy, which may reduce the ability of the rat to feed its pups, considering the expenditure energy during lactation (25). Another hypothesis that can be raised is related to the action that nicotine has in reducing the concentration of the prolactin hormone in maternal blood which is responsible for production of milk, when exposure to cigarette smoke becomes chronic (5).

Moreover, it is known that pups are born motionless, with visual and hearing deficiencies, are hairless and need their mother's care because they pick them up when they wander during the first weeks of lactation (31). Thus, we can infer that the stress experienced by mothers during lactation influenced by their maternal behavior, because stressed mothers do not tend to search for their pups to feed them and therefore there is a delayed development of pups due to of malnutrition.

In the exercised group (GN), only in the second week of lactation were the measures of weight and length significantly lower than the control group (GC), suggesting that over

time mothers have greater energy expenditure to supply the milk, which ultimately influence the delay in weight gain and length of pups (25). However, in last week (M3), the picture changed because the pups become more independent and begin to eat solid food (32).

Regarding the evolution of weight and length between times, there was little variation between deltas 1 and 2 in all groups, but at this time the pups were totally dependent on the mother for nutrition because they had little mobility (31), therefore the variation is related to the stress they experience.

In Delta 3, which is the difference between M2 and M3, there was a greater increase in both weight and length for the groups GF, GC and GN, but the GFN remained virtually the same variation of delta 1 and 2. The biggest change for the groups GF, GC and GN is explained because the pup from the twelfth day on becomes independent in the search for maternal lactation, in addition, at close to twenty days of age is when the pups is allowed to eat solids (32).

The hypothesis for why the GFN was among the delta top 3 as the other groups were, is related to the interaction between mother and pup, since it is known that this is essential for the growth and development of mammals (33). The fact the mother-pup relationship is influenced by stress, made GFN's development slower, since the mothers were exposed to two types of stress.

As for the weight of the gastrocnemius muscle, there wasn't only no significant difference between GF and GFN groups, which showed the lowest values. The same was observed in the weight and the body length of pups, suggesting that the effects of nicotine contained in cigarette smoke are also contributing factors in this case. Thus, it confirms that the muscle weight is directly related to the development of pups.

The measurement results of gastrocnemius muscle fibers cross-section could reveal the development of cubs, and no atrophy or hypertrophy. Given this, we observed that the GFN

was the group with the worst development, being the only one to show statistically significant difference compared with the control group (GC). And once again, it appears that the association of passive smoking with exercise, experienced by the mother during pregnancy and lactation, generates somatization of stress, with consequent delay in the development of pups.

In summary, we found that maternal passive smoking during pregnancy and lactation had a strong negative influence on the number of pups, on the weight and body length of the same from birth to weaning, as well as muscular development. Moreover, exercise during the swimming program positively influenced aspects such as birth, but that at the levels of energy expenditure increased required it did not allowed the same benefits throughout the lactation period. And finally, the association of second-hand smoke and physical exercise was found led to accumulation of stress, which negatively influenced the measures examined, and thus the hypothesis of this study was overthrown.

Acknowledgments

We wish to thank the technician of the Laboratory of Histology, FCT / UNESP, Sidney Siqueira Leirião for collaboration in developing the study.

References

1. Mackay J, Eriksen M 2002 The tobacco atlas. Geneva: World Health Organization.
2. Cabar FR, Carvalho FRC, Carvalho JP 2003 Efeitos do tabagismo na saúde da mulher. *Femina*. 31(4):373-5.
3. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR 1989 Do women with childhood exposure to cigarette smoking have increased fecundability? *Am J Epidemiol* 129:1079-83.
4. Baird DD, Wilcox AJ 1985 Cigarette smoking associated with delayed conception. *JAMA*. 253:2979-83.
5. Horta BL, Victora CG, Menezes AM, Barros FC 1997 Environmental tobacco smoke and breastfeeding duration. *Am J Epidemiol*. 146:128-33.
6. Chiolerio A, Bovet P, Paccaud F 2005 Association between maternal smoking and low birth weight in Switzerland: the EDEN study. *Swiss Med Wkly*. 135(35-36):525-30.
7. Mainous AG, Heuston WT 1994 The effect of smoking cessation during pregnancy on preterm delivery and low birth weight. *J. Fam. Pract.* 38:262-6.
8. DiClemente CC, Dolan-Mullen P, Windsor RA 2000 The process of pregnancy smoking cessation: implications for interventions. *Tobacco Control*. 9 (Suppl III):iii16–iii21.
9. Hackshaw A, Law M, Wald NJ 1997 The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 315: 980-8.
10. Law RL, Hackshaw AK 1996 Environmental tobacco smoke. *Br. Med. Bull*. 52:22-34.
11. Rössner S 1999 Physical activity and prevention and treatment of weight gain associated with pregnancy: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc*. 4 (Suppl): 560-3.
12. Hatch MC, Shu XO, Mclean DE 1993 Maternal exercise during pregnancy, physical fitness, and fetal growth. *Am J Epidemiol*. 137:1105-14.

13. Bishop KR, Dougherty M, Mooney R, Gimotty P, Williams B 1992 Effects of age, parity, and adherence on pelvic muscle response to exercise. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 21:401-6.
14. Bungum TJ, Peaslee DL, Jackson AW, Perez MA 2000 Exercise during pregnancy and type of delivery in nulliparae. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 29: 258-64.
15. ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists). 2002 Committee on Obstetric. Exercise during pregnancy and the postpartum period. Practice n.º 267. *Am Col Obstet Gynecol.* 99:171-3.
16. Katz VL 1996 Water exercise in pregnancy. *Semin Perinatol.* 2:285-91.
17. Mello PRB, Okay TS, Botelho C 2006 Influência da exposição à fumaça lateral do cigarro sobre o ganho de peso e o consumo alimentar de ratas gestantes: análise do peso e do comprimento dos filhotes ao nascimento. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 28(3):143-50.
18. Czekaj P, Pałasz A, Lebda-Wyborny T, Nowaczyk-Dura G, Karczewska W, Florek E, et al. . 2002 Morphological changes in lungs, placenta, liver and kidneys of pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Int Arch Occup Environ Health*75:S27-S35.
19. Edirisinghe I, Yang S, Yao H, Rajendrasozhan S, Caito S, Adenuga D, et al. 2008 VEGFR-2 inhibition augments cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction. *The FASEB Journal.* 22:297-310.
20. Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi-Filho G, Dohnnikoff M, Pereira PM, Conceição GMS, et al. 1997 Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 30:1241-7.

21. Volpato GT, Damasceno DC, Campos KE, Rocha R, Rudge MVC, Calderon IMP 2006 Avaliação do efeito do exercício físico no metabolismo de ratas diabéticas prenhes. *Rev Bras Med Esporte*. 12(5):229-33.
22. Dubowitz V, Sewry CA 2007. *Muscle biopsy: a practical approach*. 3rd Ed. China: Saunders Elsevier.
23. Nelson E, Jodscheit K, Guo Y 1999 Maternal passive smoking during pregnancy and fetal developmental toxicity. Part 1: gross morphological effects. *Hum Exp Toxicol*. 18:252-6
24. Perkins KA, Sexton JE, Dimarco A, Fonte C 1994 Acute effects of tobacco smoking on hunger and eating in male and female smokers. *Appetite*. 22:149-58.
25. Williams CM, Kanagasabai T 1984 Maternal adipose tissue response to nicotine administration in the pregnant rat: effects on fetal body fat and cellularity. *Br J Nutr*. 51:7-13.
26. Meyer MB, Tonascia JA 1977 Maternal smoking, pregnancy complications, and perinatal mortality. *Am J Obstet Gynecol*. 128:494-502.
27. Hadley CB, Main DM, Gabbe SG 1990 Risk factors for preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am J Perinatol*. 7:374-9.
28. Ward C, Lewis S, Coleman T 2007 Prevalence of maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure during pregnancy and impact on birth weight: retrospective study using Millennium Cohort. *BMC Public Health*. 81(7):1-6.
29. Lehtovirta P, Forss M 1978 The acute effect of smoking on intervillous blood flow the placenta. *Br J Obstet Gynaecol*. 85:729-1.
30. Pollard I 1984 Effects of stress administered during pregnancy on reproductive capacity and subsequent development of the offspring of rats - prolonged effects on the litters of a 2nd pregnancy. *Journal of Endocrinology*. 100(3):301-6.

31. Grotta LJ, Ader R 1969 Continuous recording of maternal behaviour in *rattus norvegicus*. *Anim. Behav.* 17:722-9.
32. Levin R, Stern JM 1975 Maternal influences on ontogeny of suckling and feeding rhythms in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 89:711-21.
33. Moriceu S, Sullivan RM 2005 Neurobiology of infant attachment. *Developmental Psychobiology.* 47:230-42.

TABLE 1

Table 1 – Mean values followed by their standard deviations of muscular weight (g), initial and final body weight (g) of rats.

GROUPS	INITIAL WEIGHT	FINAL WEIGHT
GF	229,5 ± 14,0 [214,7 – 244,3]	261,1 ± 38,2 [221,0 – 301,3]
GC	236,2 ± 12,7* [222,8 – 249,5]	285,7 ± 30,3 [253,9 – 317,5]
GFN	227,2 ± 18,78* [207,5 – 246,9]	281,4 ± 20,5 [255,9 – 307,0]
GN	231,3 ± 8,2* [221,1 – 241,6]	275,04 ± 34,0 [232,8 – 317,3]

GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (underwent to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (underwent to the swimming program). * Significant difference between initial and final weight. $p < 0,05$.

FIGURE 1

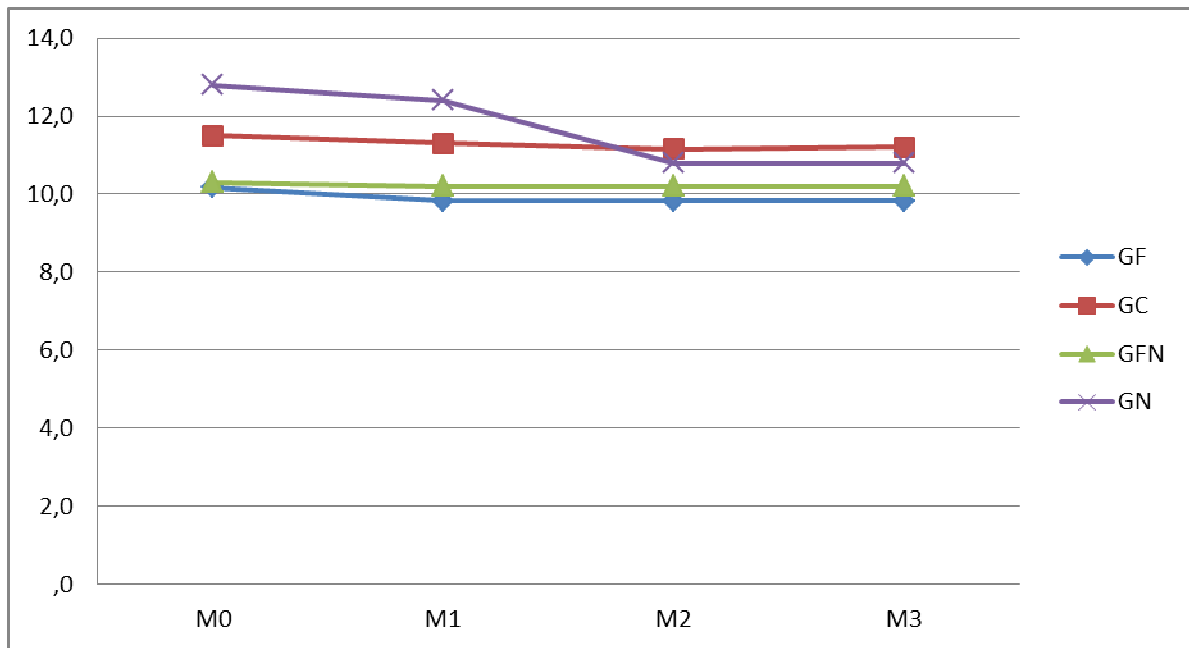


Figure 1 – Mean of number os pups: GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (underwent to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (underwent to the swimming program), in four stages: up to 24 hours after birth (M0), at seven days (M1) and fourteen days (M2) and weaned at 21 days (M3). $p < 0,05$.

TABLE 2

Table 2 – Spearman correlation index of number of pups per rat with weight (g) and length (cm) of body of pups.

		Number of pups			
		M0	M1	M2	M3
Weight of body (g)	GF	0,319	-0,058	-0,462	-0,348
	GC	-0,754	-0,794	-0,794	-0,883*
	GFN	0,464	0,500	-0,118	0,177
	GN	-0,700	-0,564	0,00	0,00
Length of body (cm)	GF	0,319	0,232	-0,051	-0,174
	GC	-0,638	-0,794	-0,794	-0,794
	GFN	0,029	0,647	0,353	0,265
	GN	-0,700	-0,205	0,316	0,00

GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (underwent to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (underwent to the swimming program), in four stages: up to 24 hours after birth (M0), at seven days (M1) and fourteen days (M2) and weaned at 21 days (M3). $p < 0,05$. * Significant difference of Spearman correlation index.

FIGURE 2

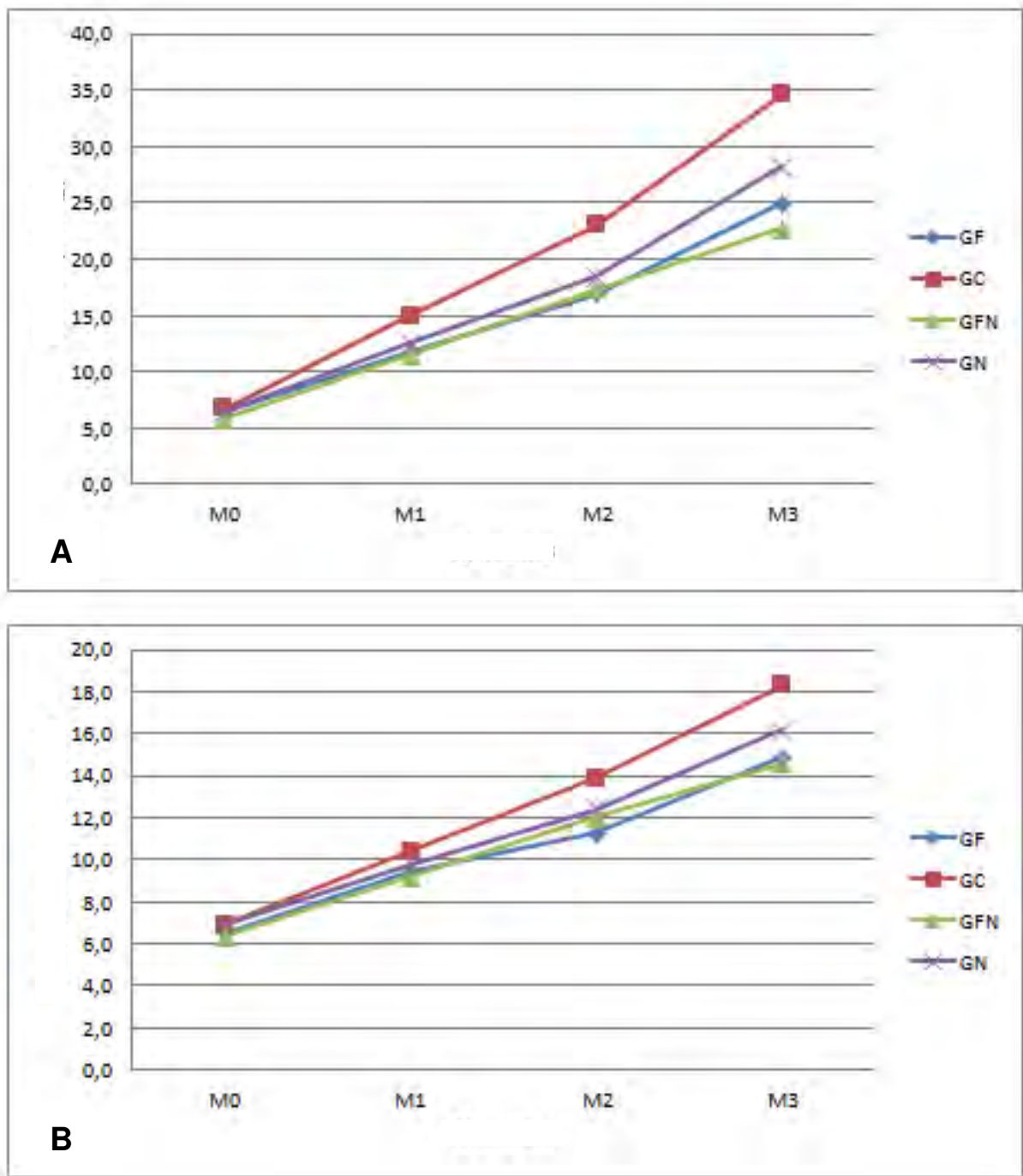


Figure 2 – A – Mean of body weight of pups; B - Mean of body length of pups. Groups: GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (underwent to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (underwent to the swimming program), in four stages: up to 24 hours after birth (M0), at seven days (M1) and fourteen days (M2) and weaned at 21 days (M3). $p < 0,05$.

TABLE 3

Table 3 – Delta of weight (g) and length (cm) of body of pups among the moments.

	Group	Delta 1	Delta 2	Delta 3
	GF	5,3	5,2	8,1
Body	GC	8,2	8,0	11,5
weight (g)	GFN	5,7	5,8	5,4
	GN	5,9	5,9	9,8
	GF	2,9	1,9	3,6
Body	GC	3,5	3,5	4,4
length (cm)	GFN	2,8	2,8	2,6
	GN	2,9	2,6	3,8

GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (underwent to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (underwent to the swimming program). Delta 1: difference between birth (M0) and seven days (M1); Delta 2: difference between seven days (M1) and fourteen days (M2); Delta 3: difference between fourteen days (M2) and 21 days (M3).

TABLE 4

Table 4 – Mean values followed by their standard deviations of weight (g) and gastrocnemius muscle fiber cross-section area (μm) of pups.

Groups	Gastrocnemius	
	Weight (g)	Cross-section area (μm)
GF	$0,08 \pm 0,03^{\text{a,c}}$	$12,96 \pm 2,31$
GC	$0,16 \pm 0,05^{\text{d,e}}$	$15,78 \pm 3,62^*$
GFN	$0,07 \pm 0,02^{\text{f}}$	$11,67 \pm 1,17$
GN	$0,11 \pm 0,02$	$13,12 \pm 0,61$

GF (exposed to cigarette smoke), GC (control), GFN (underwent to the swimming program and exposed to cigarette smoke) and GN (underwent to the swimming program). Letters are the presence of significant difference between: ^a GF and GC; ^b GF and GFN; ^c GF and GN; ^d GC and GFN; ^e GC and GN; ^f GFN and GN. * Significant difference between GC and GFN. $p < 0,05$.