

BRUNA CORRAL GARCIA VALSONI¹
MARIANA ROTTA BONFIM²
JACQUELINE BEXIGA URBAN³
FÁBIO YOSHIKAZU KODAMA¹
REGINA CELLI TRINDADE CAMARGO⁴
LUIZ CARLOS MARQUES VANDERLEI⁵
JOSÉ CARLOS SILVA CAMARGO FILHO⁵

Influência do tabagismo passivo associado ao exercício físico realizado por ratas durante prenhez e lactação, sobre o desenvolvimento dos filhotes

Influence of passive smoking associated with exercise performed by rats during pregnancy and lactation on their offspring growth

Artigo original

Palavras-chave

Poluição por fumaça de tabaco
Exercício
Prenhez
Lactação
Peso ao nascer
Ratos Wistar/crescimento & desenvolvimento

Keywords

Tobacco smoke pollution
Exercise
Pregnancy, animal
Lactation
Birth weight
Rats, Wistar/growth & development

Resumo

OBJETIVOS: 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. **MÉTODOS:** vinte e quatro 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. **RESULTADOS:** a média do nascimento de filhotes foi menor para os grupos GF (10,2) e GFN (10,3) e maior para o GN (12,8). No nascimento, somente o GFN apresentou medidas de peso ($p=0,016$) e comprimento ($p=0,02$) significativamente inferiores ao Controle, já na lactação foram os grupos expostos à fumaça de cigarro. O grupo GFN apresentou retardo no desenvolvimento muscular em relação ao GC ($p=0,03$). **CONCLUSÃO:** 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.

Abstract

PURPOSE: the purpose of this study was to evaluate mortality, weight and body length, and the gastrocnemius muscle of the offspring of pregnant rats submitted to a swimming program associated with second-hand smoke. **METHODS:** twenty-four rats were divided into 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 offspring were measured at four time points. The gastrocnemius muscle of the pups was obtained for evaluation of muscle development. **RESULTS:** the average number of offspring was lower for GF (10.2) and GFN (10.3) and higher for GN (12.8). At birth, only GFN showed significantly lower weight ($p=0.016$) and length ($p=0.02$), whereas during lactation the groups exposed to cigarette smoke showed significantly lower weight. GFN had delayed muscle development compared to GC ($p=0.03$). **CONCLUSIONS:** Passive smoking during pregnancy and lactation negatively influenced number, weight and body length of offspring from birth to weaning and muscle development, and the swimming program positively influenced these variables at birth, although it did not provide the same benefits during lactation; and their association negatively affected these measures.

Correspondência:

Bruna Corral Garcia Valsoni
Departamento de Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – FCT/UNESP
Rua Roberto Simonsen, 305
CEP: 19060-900 – Presidente Prudente (SP), Brasil

Recebido

21/06/2011

Aceito com modificações

04/07/2011

Trabalho realizado na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP – Presidente Prudente (SP), Brasil.

¹ Mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP – Presidente Prudente (SP), Brasil.

² Professora Assistente do Departamento de Educação Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP – Presidente Prudente (SP), Brasil.

³ Acadêmica do curso de Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP – Presidente Prudente (SP), Brasil.

⁴ Professora Assistente do Departamento de Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP – Presidente Prudente (SP), Brasil.

⁵ Professor Doutor do Departamento de Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP – Presidente Prudente (SP), Brasil.

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 gravidez^{4,5} e na lactação^{5,6}.

O tabagismo materno provoca déficit do crescimento do feto, levando ao maior risco de prematuridade, aborto espontâneo, malformação congênita e baixo peso ao nascer^{7,8}, sendo que este risco é aumentado proporcionalmente ao número de cigarros fumados, principalmente no terceiro trimestre gestacional⁹. 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 amamentação¹⁰.

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 fechados¹¹. 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 lateral¹².

Um estudo recente⁵ com 40 ratas Wistar verificou que a exposição à fumaça de cigarro durante a prenhez e a lactação acarretou prejuízos morfométricos e séricos tanto nas mães como para as proles, o que persistiu até a fase jovem adulta.

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 outras¹³.

Além dos benefícios que o exercício físico promove para a gestante, encontramos os relacionados com o maior peso fetal e do recém-nascido¹⁴, bem como com o menor risco de aborto, menor índice de parto prematuro¹⁵ e de cesarianas¹⁶.

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 realização¹⁷, 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 periférica¹⁸.

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 encontram 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 natação, 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 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – 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 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 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 (exposto 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 espermatozoide(s) no esfregaço vaginal, o que caracterizou o dia zero da prenhez¹⁹.

Após o nascimento, os filhotes foram alocados conforme os grupos maternos GF, GC, GFN e GN⁵, independentemente do sexo.

■ 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, em que os animais dos grupos GF e GFN foram expostos à fumaça de cigarro na câmara de fumo a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ²⁰, durante 10 minutos, uma vez ao dia, com 250 ppm (partes por milhão) de CO (monóxido de carbono) medido pelo detector de gás específico (ToxiPro[®] 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 exposição²¹, correspondendo a três cigarros por sessão. Essa dose equivale à consumida por fumantes crônicos, por totalizar em média um cigarro/dia/animal²². 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 et al.²³

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: 10 mg de alcatrão, 0,9 mg de nicotina e 10 mg 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.²⁴, 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 estas 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 dia 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, 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 $6 \mu\text{m}$ 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 e Sewry²⁵.

■ Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o software SPSS Statistics 17.0, no qual 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) 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 ($p=0,7$). Ao final do período de lactação, as ratas foram novamente pesadas e também não houve diferença significativa entre os grupos controle e experimentais ($p=0,5$), 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 ($p=0,04$), e somente o GF não apresentou diferença significativa ($p=0,108$).

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 pôde-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.

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) ($p=0,01$). 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 ao dos demais grupos. Na segunda semana de lactação (M2) observou-se que os filhotes do Grupo Controle obtiveram peso corporal superior ao dos 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 as do GF ($p=0,03$) e que as do 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 ao dos 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.

Tabela 1. Média e 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 [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: 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 significativa entre peso inicial e peso final. Considere: $p<0,05$.

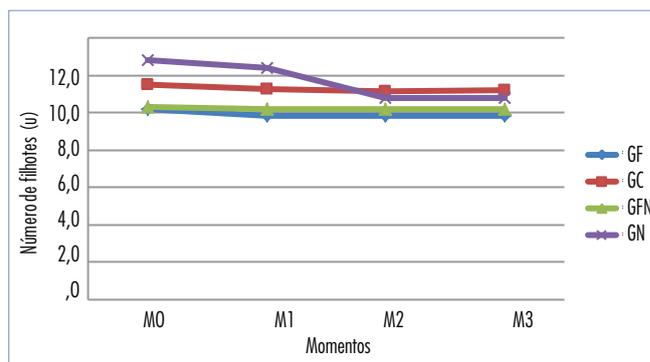


Figura 1. Média do número de filhotes dos grupos: exposto à fumaça de cigarro (GF); controle (GC); exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação (GFN); e submetido ao programa de natação (GN), em quatro momentos distintos: no nascimento (M0); com sete dias de amamentação (M1); com 14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

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 (M0=0,3; M1=-0,05; M2=-0,4 e M3=-0,3), GFN (M0=0,4; M1=0,5; M2=-0,1 e M3=0,1) e GN (M0=-0,7; M1=-0,5; M2=0,001 e M3=0,001) nos diferentes momentos, apenas o GC apresentou correlação negativa no M3 (-0,8).

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=0,01). Na segunda semana de lactação, todos os grupos apresentaram diferença significativa em relação ao GC, tendo o GF (p=0,001), o GFN (p=0,004) e o GN (p=0,02) 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 GF (M0=0,3; M1=0,2; M2=-0,05 e M3=-0,1), GC (M0=-0,6; M1=-0,7; M2=-0,7 e

M3=-0,7), GFN (M0=0,02; M1=0,6; M2=0,3 e M3=0,2) e GN (M0=-0,7; M1=-0,2; M2=0,3 e M3=0,001).

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 (Tabela 2).

Peso muscular dos filhotes

A análise da comparação do peso do músculo gastrocnêmio dos filhotes entre os diferentes grupos estudados indicou que não houve diferença significativa apenas entre GF e GFN (p≤0,05), conforme Tabela 3.

Morfometria muscular

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

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

	Grupo	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	0,000	0,000
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	0,000

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.

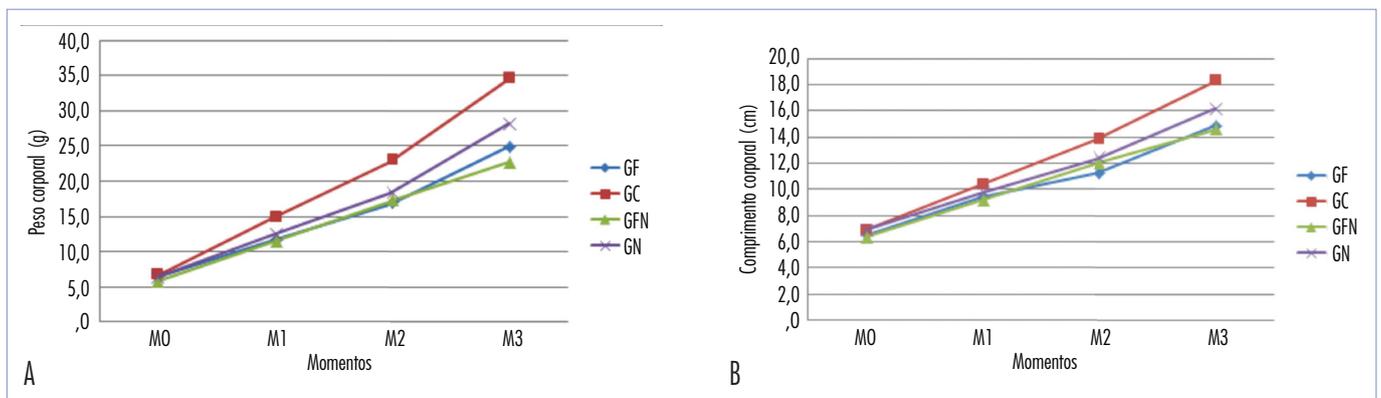


Figura 2. (A) Média do peso corporal dos filhotes; (B) Média do comprimento corporal dos filhotes. Grupos: exposto à fumaça de cigarro (GF); Controle (GC); exposto à fumaça de cigarro e submetido ao programa de natação (GFN); e submetido ao programa de natação (GN). Momentos: nascimento (M0); sete dias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

Tabela 3. 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 lactação; e GN: submetido ao programa de lactação. 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. Média e 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 ^{ac}	12,96 \pm 2,31
GC	0,16 \pm 0,05 ^{da}	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 lactação; e GN: submetido ao programa de lactação. Letras correspondem à 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: $p < 0,05$.

Discussão

No presente estudo foi testada a hipótese de que o exercício, por proporcionar inúmeros benefícios durante os períodos 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 feto²⁶. Partindo deste princípio, o modelo utilizado neste experimento de exposição à fumaça de cigarro baseou-se em estudos prévios^{20,21,23}, com o intuito de reproduzir o tabagismo passivo durante a prenhez e lactação de ratas.

O resultado do peso corporal das ratas revelou que houve aumento do período anterior à cópula para o 21º 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 cigarro²⁷. 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.¹⁹, que, 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. Os achados de Gomes e Seraphim⁵ também evidenciaram que a exposição à fumaça de cigarro durante a prenhez e a lactação reduziu o peso corpóreo das ratas.

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 lactação 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 lactação²⁸.

Em contrapartida, os grupos expostos à fumaça de cigarro apresentaram as menores médias do 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 e malformações congênicas. De fato, o parto prematuro e o aborto espontâneo têm sido verificados em estudos com humanos, nos quais a gestante é tabagista^{29,30}. Neste caso, a possibilidade do aborto e de natimortos poderia ter sido verificada pela quantidade de animais encontrados mortos, porém, pelo fato de a própria mãe eliminar os filhotes mortos ou com alterações congênicas, 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 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, em relação ao tabagismo passivo, Mello et al.¹⁹ 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.³¹ com mais de 18 mil crianças do Reino Unido, eles 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 placentário³². Além disso, durante o período gestacional eventos estressores resultam na diminuição do tamanho dos filhotes³³, 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 materno^{6,8}, 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 lactação²⁸. 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 crônica⁶.

Além disso, sabe-se que o filhote nasce praticamente imóvel, com deficiência auditiva e visual e sem pelos, necessitando dos cuidados da mãe, que os busca quando se afastam durante as primeiras semanas de lactação³⁴. 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 seus filhotes 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 filhotes²⁸. Entretanto, na última semana (M3) o quadro se alterou pelo fato de os filhotes se apresentarem mais independentes e começarem a ingerir alimentos sólidos³⁵.

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, os filhotes, neste período, totalmente dependentes da mãe para a nutrição por apresentarem pouca mobilidade³⁴. Por esse motivo, a variação está relacionada ao estresse sofrido por ela.

No delta 3, correspondente à diferença entre M2 e M3, verificou-se 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 de o filhote, a partir do 12º dia, passar a não depender da busca materna para a lactação. Além disso, próximo ao 20º dia, o filhote passa a alimentar-se de sólidos³⁵.

A hipótese levantada para o GFN não ter apresentado o delta 3 superior como os demais grupos está relacionada à interação mãe-filhote, pois sabe-se que esta é fundamental para o crescimento e desenvolvimento dos mamíferos³⁶. O fato de a 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, confirmou-se 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 prenhez e lactação, gera somatização de estresses, com conseqüente retardo no desenvolvimento dos filhotes.

Encontra-se como limitação deste estudo não ter sido avaliado o peso corporal das ratas durante todo o período compreendido entre prenhez e lactação. E como perspectivas futuras, levanta-se a possibilidade de um estudo histoquímico para a tipagem das fibras musculares.

Em síntese, 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 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

Ao técnico do Laboratório de Histologia da FCT/UNESP, Sidney Siqueira Leirião, pela colaboração

no desenvolvimento da pesquisa e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Pró-Reitoria de Administração e Planejamento (PROAP) pelo apoio financeiro.

Referências

- Mackay J, Eriksen M. The tobacco atlas. Geneva: World Health Organization; 2002.
- Cabar FR, Carvalho JP. Efeitos do tabagismo na saúde da mulher. *Femina*. 2003;31(4):373-5.
- Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Do women with childhood exposure to cigarette smoking have increased fecundability? *Am J Epidemiol*. 1989;129(5):1079-83.
- Baird DD, Wilcox AJ. Cigarette smoking associated with delayed conception. *JAMA*. 1985;253(20):2979-83.
- Gomes PRL, Seraphim PM. Efeito da exposição à fumaça de cigarro durante a prenhez e a lactação de ratas e sua prole sobre parâmetros séricos e morfométricos. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2010;32(12):591-6.
- Horta BL, Victora CG, Menezes AM, Barros FC. Environmental tobacco smoke and breastfeeding duration. *Am J Epidemiol*. 1997;146(2):128-33.
- Chiolero A, Bovet P, Paccaud F. Association between maternal smoking and low birth weight in Switzerland: the EDEN study. *Swiss Med Wkly*. 2005;135(35-36):525-30.
- Mello PR, Okay TS, Botelho C. The effects of exposing rats to cigarette smoke on milk production and growth of offspring. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(3):267-73.
- Mainous AG 3rd, Heuston WT. The effect of smoking cessation during pregnancy on preterm delivery and low birth weight. *J Fam Pract*. 1994;38(3):262-6.
- DiClemente CC, Dolan-Mullen P, Windsor RA. The process of pregnancy smoking cessation: implications for interventions. *Tob Control*. 2000;9 Suppl 3:III16-21.
- Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 1997;315(7114):980-8.
- Law MR, Hackshaw AK. Environmental tobacco smoke. *Br Med Bull*. 1996;52(1):22-34.
- Rössner S. Physical activity and prevention and treatment of weight gain associated with pregnancy: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc*. 1999;31 (11 Suppl):S560-3.
- Hatch MC, Shu XO, McLean DE, Levin B, Begg M, Reuss L, et al. Maternal exercise during pregnancy, physical fitness, and fetal growth. *Am J Epidemiol*. 1993;137(10):1105-14.
- Bishop KR, Dougherty M, Mooney R, Gimotty P, Williams B. Effects of age, parity, and adherence on pelvic muscle response to exercise. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 1992;21(5):401-6.
- Bungum TJ, Peaslee DL, Jackson AW, Perez MA. Exercise during pregnancy and type of delivery in nulliparae. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2000;29(3):258-64.
- ACOG Committee Obstetric Practice. ACOG Committee opinion. Number 267, January 2002: exercise during pregnancy and the postpartum period. *Obstet Gynecol*. 2002;99(1):171-3.
- Katz VL. Water exercise in pregnancy. *Semin Perinatol*. 1996;20(4):285-91.
- 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.
- 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 Suppl:S27-35.
- Edirisinghe I, Yang SR, 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. *FASEB J*. 2008;22(7):2297-310.
- Mello PRB, Okay TS, Dores EFGC, Botelho C. Marcadores de exposição tabágica em ratas lactantes utilizando um modelo de exposição passiva desde o início da gestação. *Pulmão RJ*. 2005;14(4):289-93.
- 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. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30(10):1241-7.
- 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):229-33.
- Dubowitz V, Sewry CA. *Muscle biopsy: a practical approach*. 3rd ed. London: Saunders/Elsevier; 2007.
- Nelson E, Jodscheit K, Guo Y. Maternal passive smoking during pregnancy and fetal developmental toxicity. Part 1: gross morphological effects. *Hum Exp Toxicol*. 1999;18(4):252-6.
- 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(2):149-58.
- Williams CM, Kanagasabai T. Maternal adipose tissue response to nicotine administration in the pregnant rat: effects on fetal body fat and cellularity. *Br J Nutr*. 1984;51(1):7-13.
- Meyer MB, Tonascia JA. Maternal smoking, pregnancy complications, and perinatal mortality. *Am J Obstet Gynecol*. 1977;128(5):494-502.
- Hadley CB, Main DM, Gabbe SG. Risk factors for preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am J Perinatol*. 1990;7(4):374-9.
- Ward C, Lewis S, Coleman T. Prevalence of maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure during pregnancy and impact on birth weight: retrospective study using Millennium Cohort. *BMC Public Health*. 2007;7:81.
- Lehtovirta P, Fors M. The acute effect of smoking on intervillous blood flow the placenta. *Br J Obstet Gynaecol*. 1978;85(10):729-31.
- Pollard I. Effects of stress administered during pregnancy on reproductive capacity and subsequent development of the offspring of rats – prolonged effects on the litters of a second pregnancy. *J Endocrinol*. 1984;100(3):301-6.
- Grota LJ, Ader R. Continuous recording of maternal behaviour in *Rattus norvegicus*. *Anim Behav*. 1969;17(4):722-9.
- Levin R, Stern JM. Maternal influences on ontogeny of suckling and feeding rhythms in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1975;89(7):711-21.
- Moriceau S, Sullivan RM. Neurobiology of infant attachment. *Dev Psychobiol*. 2005;47(3):230-42.