

**Efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre a
expressão de GLUT4 em ratas prenhes e lactantes e sua
prole**

Patricia Rodrigues Lourenço Gomes

Presidente Prudente

2010



Efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre a expressão de GLUT4 em ratas prenhes e lactantes e sua prole

Patricia Rodrigues Lourenço Gomes

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP, para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Patricia Monteiro Seraphim

Presidente Prudente

2010

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Edson** e **Maria**, grandes heróis,
aqueles que mais do que apoiar, sonharam os meus sonhos fazendo deles o seu
próprio.
À minha irmã **Gabriela**, pois em pensamento e companhia deu-me forças
para continuar sendo seu exemplo de determinação.

AGRADECIMENTO

O mestre...

... é um indivíduo que adquiriu conhecimento especializado sobre uma determinada área do conhecimento. Com sua grande especialização no assunto, é capaz de dar aulas a pupilos. Habitualmente é usado como título acadêmico para aquele que defendeu um mestrado. Assim sendo, aprovada esta dissertação, torno-me mestra! Passo a ter um título cujo significado me inibe, dada a sua nobreza, assim não poderia deixar de agradecer às pessoas que fizeram parte desse momento especial.

Minha “mestra” **Patricia**, com toda a atenção e paciência, apresentou-me não apenas à pesquisa científica, mas também a um ambiente de estudo e atendimento, pautado no comprometimento sem, contudo, perder o humanismo, a amizade e a alegria. Agradeço, principalmente por acreditar em minha capacidade e nos frutos deste trabalho de dissertação.

Por isso, querida orientadora, permita-me neste momento em que obtenho o título de “mestre”, substituir o teu tão nobre título por palavra sem cunho acadêmico, mas igualmente bela: *amiga*.

Meus pais, **Edson** e **Maria**, e a minha irmã, **Gabriela**. Aos primeiros pelo alicerce moral, refúgio de todas as horas, e pelo incentivo incondicional; à segunda, pela partilha do amor e dos ensinamentos desse casal.

Àquele que esteve em meu coração e pensamentos, por anos, e usou de paciência e compreensão para me incentivar em todos os momentos, até hoje.
Paulo Raymundo.

Aos professores **Dra. Edna Maria do Carmo**, **Dr. Ismael Forte Freitas Júnior**, **Dra. Cecília Mareze da Costa**, pelas preciosas considerações na composição deste trabalho e na minha formação acadêmico-profissional.

Aos integrantes do **Grupo de Pesquisa em Fisiologia – GPFis**, amigos, companheiros e colaboradores com os quais compartilhei momentos de alegrias, tristezas e aprendizado.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para a obtenção do título de mestre, meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

“A cada dia que vivo mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade.”

Carlos Drummond de Andrade

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1. Adaptação metabólica durante a gestação e lactação	14
1.2. O tabagismo durante a gestação e lactação	15
1.3. Tabagismo e resistência à insulina	16
1.4. Relação entre resistência à insulina e transportador de glicose.....	17
2. Objetivos	21
3. Material e Métodos.....	22
3.1. Animais de Experimentação.....	22
3.2. Caracterização do Sistema de Inalação.....	22
3.3. Desenho Experimental	24
3.4. Protocolos de Experimentação	25
3.5. Coleta do Material.....	26
3.6. Quantificação do RNAm do gene do GLUT4, SOCS3 e HIF1 α	27
3.6.1. Preparação das amostras para o RT-PCR	27
3.6.2. Verificação da integridade do RNA total.....	27
3.6.3. Obtenção do cDNA a partir do RNA total	28
3.6.4. PCR para amplificação dos fragmentos dos genes do GLUT4 e da β -actina.....	28
3.7. Quantificação do conteúdo protéico de GLUT4.....	29
3.7.1. Preparação das amostras para Western Blotting	30
3.7.2. Método Lowry para dosagem de proteína	30
3.7.3. Western Blotting – Quantificação de Proteína	31
3.8. Análise de Dados	34
4. Resultados.....	35
4.1. Resultados das Mães.....	35
4.1.1. Análise do Peso	35
4.1.2. Análise de Glicemia	37
4.1.3. Análise da expressão do RNAm de GLUT4, SOCS3 e HIF1 α e do conteúdo protéico do GLUT4.....	37
4.1.4. Análise da correlação entre RNAm de GLUT4, SOCS3 e HIF1 α em ratas.....	39
4.2. Resultados das Proles.....	41
4.2.1. Análise do Peso	41

4.2.2. Análise de Glicemia	42
4.2.3. Análise da expressão do RNAm de GLUT4, SOCS3, HIF1 α em prole macho e fêmea.....	43
4.2.3.1. Prole Fêmea.....	43
4.2.3.2. Prole Macho	45
4.2.4. Análise da correlação entre RNAm de GLUT4, SOCS3 e HIF1 α em proles.....	47
4.2.4.1. Prole Fêmea.....	47
4.2.4.2. Prole Macho	48
5. Discussão	49
6. Conclusão	55
7. Referência.....	56
8. Anexo	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Dendrograma do alinhamento múltiplo de todos os membros da família GLUT	19
FIGURA 2 – Modelo proposto da estrutura da proteína transportadora de glicose	20
FIGURA 3 – Desenho esquemático da câmara de inalação para exposição dos animais à fumaça de cigarro	23
FIGURA 4 – Vista externa da câmara de inalação.....	24
FIGURA 5 – Peso corpóreo das ratas durante os períodos reprodutivos	36
FIGURA 6 – Níveis plasmáticos da glicemia de jejum em ratas	37
FIGURA 7 – Expressão do gene e conteúdo protéico de GLUT4 em ratas	38
FIGURA 8 – Expressão do gene de SOCS3 e HIF 1 α em ratas.....	39
FIGURA 9 – Correlação entre a expressão de RNAm de GLUT4 e HIF1 α em ratas.....	40
FIGURA 10 – Correlação entre a expressão de RNAm de GLUT4 e SOCS3 em ratas	40
FIGURA 11 – Evolução do peso médio das proles ao nascer, no 1º e no 2º mês de vida..	41
FIGURA 12 – Níveis plasmáticos da glicemia de jejum das proles macho e fêmea	43
FIGURA 13 – Expressão do gene e conteúdo protéico de GLUT4 em prole fêmea.....	44
FIGURA 14 – Expressão do gene SOCS3 e HIF1 α em prole fêmea	45
FIGURA 15 – Expressão do gene e conteúdo protéico de GLUT4 em prole macho.....	46
FIGURA 16 – Expressão do gene SOCS3 e HIF1 α em prole macho	47
FIGURA 17 – Correlação entre a expressão de RNAm de GLUT4, HIF1 α e SOCS3 em fêmea	48
FIGURA 18 – Correlação entre a expressão de RNAm de GLUT4, HIF1 α e SOCS3 em macho	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Peso corpóreo e tecidual das ratas prenhes no momento do sacrifício **35**

TABELA 2 – Peso dos tecidos da prole macho e fêmea no momento do sacrifício **42**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA – Albumina bovina sérica
cDNA – Ácido nucléico complementar
CO – Monóxido de carbono
COHb – Carboxihemoglobina
DEPC – Dietilpirocarbonato
DNA – Ácido nucléico
dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DTT – Ditioneitol
ECL - Reação de quimioluminescência
EDTA - Etilenodiaminatetraacetato dissódico
EPM – Erro padrão da média
EtBr – Brometo de Etídio
GLUT4 – Transportador de glicose 4
HIF-1 – Fator induzido por hipóxia 1
HIF – 1a – Fator induzido por hipóxia 1a
HRP - Anti rabbit IgG, horseradish peroxidase
i.p. – Intra peritoneal
MT – Membrana total
PDS – Tampão fosfato salina
RI – Resistência à insulina
RNA – Ácido ribonucleico
RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR – Reverse transcriptase – Polimerase chain reaction
SDS – Sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
SOCS3 – Supressor de sinalização de citocina 3
TEMED – N, N, N', N' - tetrametiletilenodiamina
TNF α – Fator de necrose tumoral alfa
Tris – Trizma base- tris (hidroximetil) aminometano

RESUMO

A gravidez é um período de ajustes metabólicos e, quando associado ao tabagismo provoca alterações que trazem malefícios tanto à saúde materna quanto à saúde fetal. Assim, o estudo investigou o efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre a expressão do transportador de glicose GLUT4 e parâmetros séricos e morfométricos de ratas prenhes e sua prole. Foram utilizadas ratas Wistar divididas em: CG- controle sacrificadas após a gestação, com prole adotada pelo grupo CL; CL - controle sacrificadas após o término da lactação; FG – expostas à fumaça de cigarro até o período gestacional e sacrificadas posteriormente, com prole adotada pelo grupo FL; FG – expostas à fumaça de cigarro até o fim da amamentação e posteriormente sacrificadas. As proles foram divididas por sexo e de acordo com a exposição ou não da rata à fumaça. Foram coletados sangue e tecidos para análise de glicemia e do conteúdo gênico e protéico de GLUT4. Nas ratas expostas à fumaça de cigarro, houve redução de peso corpóreo e de tecido adiposo, aumento da glicemia e modulação do transportador GLUT4 no músculo esquelético. Nas proles, houve redução do peso corpóreo, redução na massa adiposa e aumento na glicemia de machos, sem alteração nas fêmeas. Houve menor expressão de GLUT4 em fêmeas de ratas expostas. Este estudo mostra que o tabagismo influencia não somente parâmetros morfométricos, mas também parâmetros metabólicos tanto de ratas prenhes e latantes como de sua prole, exaltando a periculosidade presente no ato de fumar durante gestação/amamentação.

PALAVRAS-CHAVE: Gestação, Tabagismo, GLUT4, homeostasia glicêmica.

ABSTRACT

Pregnancy is a period of metabolic adjustments, and when associated with cigarette smoke causes changes both to maternal health as the fetal. The study has investigated the effect of cigarette smoke exposure on the expression of glucose transporter GLUT4 and morphometric parameters and serum of pregnant smoker rats and their offspring. Wistar rats were divided in: CG- nonsmokers sacrificed after pregnancy with offspring adopted by CL; CL – nonsmoker group sacrificed after the end of lactation; FG – smoker group sacrificed after pregnancy with offspring adopted by FL; FL – smoker sacrificed after the end of lactation. The offspring was divided by sex and according to the protocol of their mothers. Blood and tissue were collected for analysis of glucose and the content of GLUT4 gene and protein. In smoker mothers, body weight and adipose tissue were reduced, glucose level was increased, and GLUT4 expression was higher in skeletal muscle. In offspring, there was decrease of body weight, reduction in adipose tissue of adopted males, increase in glucose serum in males, without change in females. There was increase of GLUT4 expression in females adopted by smoker mothers, and reduction in offspring not adopted. This study showed that the cigarette smoke exposure affects not only the morphometric parameters, but also metabolic parameters of both mothers and offspring, exalting the danger presents in the act of smoking during pregnancy and lactation.

KEYWORDS: pregnancy, cigarette smoking, GLUT4, glucose homeostasis.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Adaptação metabólica durante a gestação e lactação

A gravidez é um período em que a mulher é transitoriamente submetida a alterações metabólicas que resultam em um quadro semelhante à síndrome metabólica, mas que geralmente são cuidadosamente reguladas para fornecer um suprimento ideal de substratos para a mãe e para o feto. Observa-se no final da gravidez de ratas uma alta taxa de utilização de glicose pelo conceito, que representa 23% da taxa de utilização total de glicose pelo organismo materno. Além disso, em resposta ao estímulo pela insulina, a placenta ainda demonstra um aumento adicional de 30% na utilização de glicose¹.

Este fluxo representativo de glicose direcionado ao conceito é garantido pela resistência à ação da insulina no tecido adiposo e na musculatura^{1,2}. Quando levados em consideração todos os tecidos responsivos à insulina, a captação de glicose diminui de 40 a 60% durante uma gravidez normal, tanto em humanos como em roedores^{3,4}. Sabe-se que os aumentos das concentrações plasmáticas materna de esteróides sexuais, prolactina, lactogênio placentário e corticosteróides estão relacionados às alterações acima descritas⁵.

Certamente a placenta, uma fonte de estrógenos, progesterona e gonadotrofina coriônica, é o órgão que desempenha o papel principal nestas alterações⁶. Além destes hormônios, a unidade feto-placentária produz e secreta, entre outros, hormônios como a leptina⁷, resistina⁸, hormônio do crescimento⁹, fatores de crescimento semelhante à insulina I e II (IGFI e II)¹⁰ e hormônio liberador de corticotrofina¹¹. O desenvolvimento da unidade feto-placentária desencadeia desta maneira, a produção e a liberação para a corrente sanguínea de uma série de hormônios que, salvo situações não fisiológicas, são produzidos

em territórios bem definidos do organismo materno. Este fato torna demasiadamente complexa a origem das alterações maternas que se relacionam ao controle da homeostasia glicêmica durante a gestação e a lactação.

1.2. O tabagismo durante a gestação e lactação

O tabagismo é hoje um dos principais problemas de saúde pública, é notória a participação do tabaco no aumento e/ou agravamento de doenças cardiovasculares, pulmonares, circulatórias e numerosos tipos de câncer¹². O tabagismo, durante a gestação e a lactação, pode associar-se às alterações metabólicas acima citadas e trazer malefícios tanto à saúde materna quanto à saúde fetal, afetando todas as fases da reprodução humana, da gametogênese à lactação¹³.

Estudos epidemiológicos demonstraram que, a exposição fetal ao fumo durante a gestação está associada com adversidades na saúde do pós-nato, incluindo obesidade, hipertensão e diabetes tipo 2^{14,15}. Experimentos em animais demonstraram que a exposição fetal e neofetal à nicotina, a níveis representativos para mulheres que fumam ou usam terapia de reposição de nicotina, resulta em danos na homeostasia glicídica pós natal, hiperinsulinemia e dislipidemia^{16,17}.

Na gestação, o tabagismo dobra a chance de ocorrência de baixo peso ao nascer, é responsável por 8% dos partos prematuros, 5% de todas as mortes perinatal, pode contribuir para a síndrome da morte súbita do bebê, além de causar importantes alterações no desenvolvimento do sistema nervoso fetal^{18,19}. Filhos de mães fumantes ganham peso numa velocidade menor que filhos de não-fumantes, ao medir o ganho de peso em um período de 14 dias, foi observado que os filhos de fumantes apresentavam ganho ponderal médio 40% menor que os filhos de não-fumantes^{20,21}.

Sabe-se que o cigarro é formado por diversos compostos nocivos à saúde, entre os mais estudados estão a nicotina e o monóxido de carbono (CO). Na mãe a nicotina provoca, entre outras, alterações súbitas e momentâneas no aparelho cardiovascular, enquanto que, a exposição fetal, nas fases pré e perinatal, têm sido relacionadas a alterações que irão prejudicar o desenvolvimento da criança e do jovem²².

Assim como a nicotina, o CO também contribui negativamente no período gestacional, pois é um gás tóxico produzido pela combustão incompleta de matéria orgânica, embora existam outras fontes de exposição, como a poluição atmosférica. O CO liga-se à hemoglobina materna e fetal no sítio onde se deveria ligar o oxigênio, com afinidade 200 vezes maior que este, formando a carboxihemoglobina (COHb), que em altas concentrações provoca hipóxia tecidual, estimulando a eritropoiese e causando uma elevação do hematócrito da gestante fumante e de seu feto. Isto implica em hiperviscosidade sangüínea, aumento do risco de infarto cerebral no neonato, e mau desempenho da placenta²².

O tabagismo também aumenta a resistência à insulina (RI) por alterar a distribuição da gordura corporal associada com inflamação sistêmica de baixo grau, ou por exercer uma influência tóxica sobre o tecido pancreático^{23,24}. Componentes químicos do cigarro podem alterar diretamente o transporte de glicose intracelular ou, indiretamente alterá-lo através de mudanças na química do fluido sangüíneo²⁵.

1.3. Tabagismo e resistência à insulina

Um crescente corpo de evidências indica que o tabagismo está associado com um quadro de resistência à insulina e diminuição da tolerância à glicose²⁶. A literatura atual

aponta uma relação dose-resposta existente entre tabagismo e desenvolvimento de diabetes tipo II em adultos^{27,28}.

O tabagismo altera o metabolismo em vários aspectos que podem afetar a sensibilidade à insulina. O fumo está associado com aumento da gordura abdominal (maior relação cintura-quadril)^{28,29,30} aumento de ácidos graxos livres (AGL) e mobilização de glicerol, quadro de dislipidemias (aumento de LDL – Low Density Lipoprotein e diminuição de HDL – High-density lipoprotein), disfunção endotelial, aumento na viscosidade sanguínea, estado de hipercoagulabilidade e diminuição da sensibilidade à insulina^{26, 31, 32, 32}.

HOUSTON, 2006³³, num estudo epidemiológico mostraram que a própria fumaça do cigarro pode causar intolerância à glicose, o que é precursora de diabetes e doença aterosclerótica. Encontraram forte associação entre exposição à fumaça do cigarro e incidência de intolerância à glicose durante estudo longitudinal de 15 anos, sendo 22 % entre os fumantes e 17% entre os não-fumantes expostos à fumaça. Além disso, demonstraram que os não fumantes com exposição passiva à fumaça do cigarro apresentavam maior risco de desenvolver intolerância à glicose comparados àqueles não-fumantes e sem exposição passiva ao cigarro.

1.4. Relação entre resistência à insulina e transportador de glicose

Para suprir os requerimentos energéticos de uma célula, a glicose deve fluir para dentro da mesma, sendo transportada, em sua maioria, por difusão facilitada, o que envolve a participação de uma proteína transportadora. Em alguns tecidos, este processo é estimulado pela insulina, um hormônio anabólico que provoca a síntese de glicogênio tanto

no tecido hepático quanto no tecido muscular, estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos, além de reduzir a lipólise³⁴.

A via de sinalização da insulina envolve sua ligação com receptor, o que promove a autofosforilação dos resíduos de tirosina de suas subunidades (Fig. 01). Este processo desencadeia subseqüentes fosforilações de vários substratos protéicos como os membros da família dos substratos do receptor de insulina (IRS) -1, -2, -3 e -4, Shc, Gab-1, p60dok, Cbl, JAK2 e APS. Os domínios de fosfotirosina nestes substratos se ligam ao domínio SH2 em proteínas tais como fosfatidilinositol 3 – cinase (PI(3)K). Uma vez ativada a PI(3)K pode ocorrer a fosforilação da PKB/Akt, em resíduos de serina/treonina. A PKB/Akt por sua vez estimulará a translocação de transportador de glicose (GLUT) para a membrana plasmática^{34, 35}.

Os GLUTs são uma família de 13 membros, denominadas GLUTs 1 a 12 e HMIT (transportador de mioinositol com H⁺ acoplado), os quais permitem a difusão facilitada de glicose, por gradiente de concentração, através da membrana plasmática³⁶. Devido a diferenças estruturais e funcionais dos GLUTs, a partir de um alinhamento múltiplo, a família foi dividida em três subclasses (I-III)³⁷.

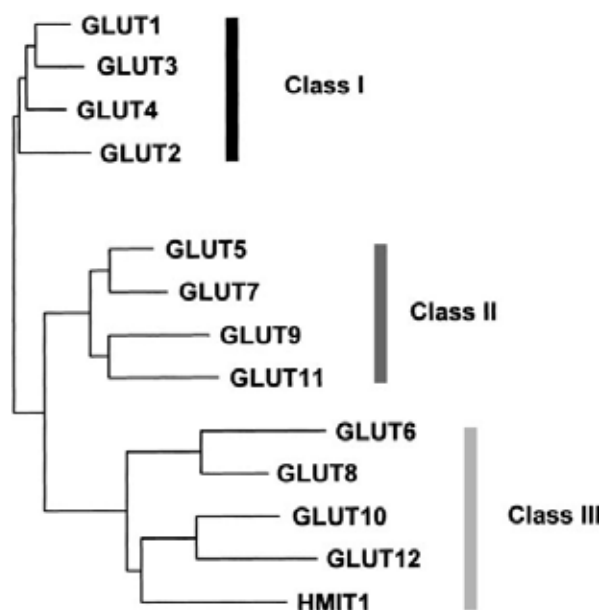


Fig. 01. Dendrograma de um alinhamento múltiplo de todos os membros da família GLUT.

O GLUT4 é o transportador insulino-dependente, mais abundante nas membranas celulares do músculo esquelético, cardíaco e tecido adiposo. A dependência consiste no fato de que sem estimulação pelo hormônio insulina a densidade do GLUT4 na membrana é extremamente baixa, estando presente em vesículas citoplasmáticas. Após a estimulação, esses transportadores são translocados para a membrana e o transporte de glicose é aumentado. Modificações na expressão deste gen (ou gene), tanto em tecido adiposo quanto em músculo esquelético, correlacionam-se de maneira direta com aumento ou redução da sensibilidade insulínica³⁸.

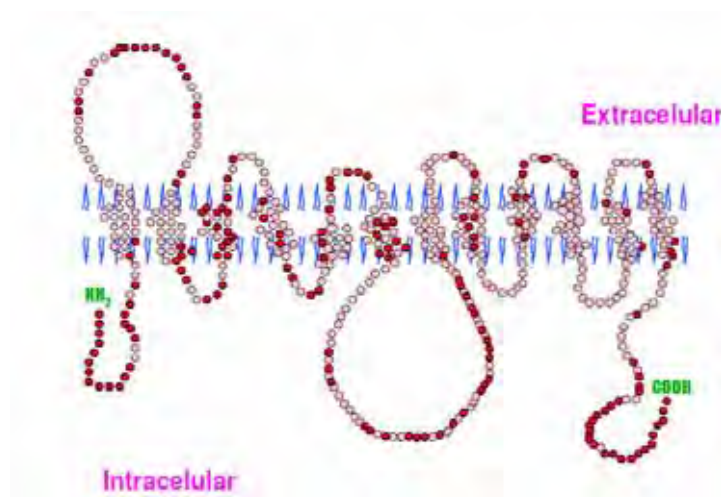


Fig. 02 – Modelo proposto da estrutura da proteína transportadora de glicose (MUECKLER, 1985) . A figura mostra a homologia entre as isoformas GLUT1 e GLUT4. As bolinhas róseas correspondem aos aminoácidos homólogos entre as duas isoformas, e as bolinhas vermelhas correspondem aos aminoácidos heterólogos.

Reduções na expressão de GLUT4 têm sido associadas, entre outros, com inflamação e desenvolvimento de RI. Algumas situações, tais como gestação, diabetes e síndrome dos ovários policísticos, sem presença de RI, também já mostraram que se acompanham de redução na expressão do GLUT4³⁸. O fumo também está associado a um prejuízo na resposta do teste de tolerância à glicose e RI; com risco de desenvolvimento semelhante em fumantes passivos e em fumantes ativos³³.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Investigar o efeito da exposição à fumaça de cigarro na homeostasia glicídica, parâmetros morfométricos e expressão da proteína envolvida no transporte da glicose insulino-mediado, GLUT4, em músculo esquelético de ratas durante a prenhez e a lactação e em sua prole.

Investigando a participação de dois fatores:

a) inflamação, por meio da análise de expressão de proteína supressora da sinalização de citocinas 3, SOCS3;

b) hipóxia por meio da análise de expressão do fator transcricional induzido por hipóxia 1α – HIF1 α .

MATERIAL E MÉTODO

3. Material e Métodos

3.1. Animais de experimentação

Para a realização do experimento foram utilizadas 40 ratas virgens, Wistar, com 2 meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP - Campus de Botucatu. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP - Campus de Presidente Prudente, alocados em gaiolas plásticas coletivas na disposição de duas ratas e um rato para que houvesse o acasalamento. Após o acasalamento as ratas foram alocadas em gaiolas individuais com sua prole até o momento programado para o sacrifício. As proles, após o desmame (21 dias), foram alocadas em gaiolas coletivas e mantidas até 2 meses de idade.

A temperatura média de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 07:00 as 19:00 horas (período claro) e 19:00 as 07:00 horas (período escuro). Esses animais foram alimentados com ração padrão (Supra Lab, Alisul Ind. Alimentos. Ltda, RS) e água fornecida *ad libitum*. O estudo obedeceu os “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP, Campus Presidente Prudente, processo nº 296/2008.

3.2. Caracterização do sistema de inalação

O modelo de inalação utilizado foi o descrito por Cedon Filha, 1994³⁹, com adequações do espaço para a gaiola e válvulas realizadas pelo Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) de Presidente Prudente – SP.

Para a câmara de inalação foi utilizada uma caixa com estrutura de alumínio e vidro, medindo 100x44x44 centímetros, hermeticamente fechada e dividida em dois compartimentos por um tabique de vidro escuro com um pertuito central de uma polegada de diâmetro. Um dos compartimentos da caixa serviu para a colocação de cigarros acesos em um suporte, de forma que ficassem na posição vertical, o outro compartimento foi destinado à exposição dos animais.

Do lado que ficaram os cigarros, esteve conectada à câmara uma fonte de ar comprimido com fluxo de 10 L/min permitindo a combustão dos cigarros e propiciando a condução da fumaça para o outro lado da caixa, onde foram alocados os animais, dentro da gaiola. No compartimento dos animais havia um orifício de drenagem de ar possibilitando a exaustão parcial da mistura.

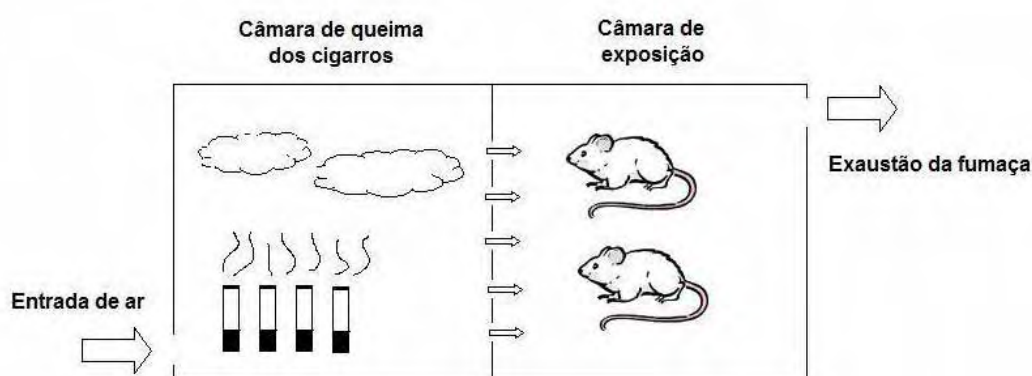


Fig. 03 – Desenho esquemático da câmara de inalação utilizada para exposição dos animais à fumaça.



Fig. 04 – Vista externa da câmara de inalação utilizada para exposição dos animais à fumaça.

3.3. Desenho Experimental

- Grupo Mãe:

A amostra foi formada por 40 ratas Wistar, prenhes, distribuídas aleatoriamente em quatro grupos de 10 animais cada:

- CG: controles não expostas à fumaça de cigarro sacrificadas ao término da gravidez, com sua prole adotada pelo grupo CL;
- CL: controles não expostas à fumaça de cigarro sacrificadas ao término da lactação;
- FG: expostas à fumaça de cigarro durante o período da gravidez, com sua prole adotada pelo grupo FL;
- FL: expostas à fumaça de cigarro durante a gestação e lactação.

- Grupo Prole

A prole foi restrita ao número de 6 animais por mãe, divididas por sexo, sacrificados com 2 meses de idade (fase jovem adulto), sendo 21 dias de lactação e 39 dias de alimentação à base de ração padrão.

- Grupo Pcg: (n=20) prole das ratas do grupo CG (macho e fêmea);
- Grupo Pcl: (n=20) prole das ratas do grupo CL (macho e fêmea);
- Grupo Pfg: (n=20) prole das ratas do grupo FG (macho e fêmea);
- Grupo Pfl: (n=20) prole das ratas do grupo FL (macho e fêmea).

Todos os animais utilizados permaneceram no biotério sob as mesmas condições, sendo sacrificados entre o período das 14-16h, em jejum de 6-8 h.

3.4. Protocolos de Experimentação

As ratas dos grupos fumantes (FG e FL) foram submetidas a um protocolo de exposição à fumaça da combustão de 4 cigarros, durante 30 minutos, duas vezes ao dia, cinco dias por semana que constou de três fases: pré-gestação, gestação e lactação. Esta dose, que totalizou um cigarro/dia por animal, foi determinada a partir de experimentos prévios que relataram ser esta a dose equivalente a níveis semelhantes em fumantes crônicos humanos que consomem entre 10 e 20 cigarros por dia⁴⁰.

Na fase de pré-gestação, que compreendeu 15 dias, os animais dos grupos FG e FL foram submetidos ao protocolo de exposição à fumaça. A fase gestacional consistiu na exposição dos animais do grupo FG e do grupo FL, por um período de aproximadamente

20-25 dias (período da gestação). Na fase de lactação o grupo FL foi submetido ao protocolo de exposição à fumaça, por 21 dias.

Foram utilizados cigarros da mesma marca durante todo o experimento, adquiridos comercialmente, com a composição descrita pelo fabricante: mistura de fumos, açúcares, papel de cigarros, estratos vegetais, agentes de sabor, gerando para cada queima de cigarro o valor de 0,7 mg de nicotina, 8 mg de alcatrão e 9 mg de monóxido de carbono.

3.5. Coleta de Material

Os animais foram sacrificados sob anestesia com cloridrato de xilazina (Dorcipec, Vallée Produtos Veterinários, Brasil – 40mg/Kg i.p. para mães e 20mg/Kg i.p para proles) e cloridrato de quetamina (Dopalen, Divisão Vetbrands Saúde Animal, Brasil – 40mg/Kg i.p. para mães e 20mg/Kg i.p para proles)⁴¹, de acordo com os períodos supracitados. Em seguida foram extraídos tecido adiposo branco intraperitoneal (periuterino para fêmeas e periepididimal para machos), coração, fígado e músculo esquelético gastrocnêmio. Imediatamente após a retirada, os tecidos foram pesados para comparação entre os grupos, identificados, congelados em nitrogênio líquido e guardados a temperatura de -70°C para posterior processamento. Durante a realização do protocolo de experimentação todos os animais foram pesados e foi feita medida do comprimento nasoanal. Também foi coletado sangue da veia cava inferior para análise sérica de glicemia por colorimetria (kits Bioclin, Quibasa, Brasil).

3.6. Quantificação do RNAm do gene do GLUT4, SOCS3 e HIF-1 α

Para a quantificação do gene do GLUT4, SOCS3 e HIF-1 α foi realizada a técnica de RT-PCR (*reverse transcriptase-polimerase chain reaction*).

3.6.1. Preparação das amostras para o RT-PCR

As amostras de tecidos musculares e adiposo foram homogeneizadas em homogeneizador modelo OMNI TH - USA (Life Technologies_{tm} – GIBCO BRL, Gaithersburg, USA) com TRIZOL Reagent[®] (Invitrogen) conforme especificação do fabricante, para obtenção do RNA total das amostras.

A análise da concentração de RNA total foi feita utilizando-se 1 μ L da amostra solubilizada de RNA total adicionado a 79 μ L de água DEPC para leitura em espectrofotômetro (Gene Quant, AmershamBiosciences, GE Healthcare) em 260 nm.

3.6.2. Verificação da integridade do RNA total

Para verificar a integridade do RNA total extraído foi realizada uma preparação das amostras para corrida em gel de agarose por eletroforese. 1 μ g de cada amostra foram acrescidos a 1 μ L de Brometo de Etídio (EtBr). Em seguida, tal mistura foi aplicada no gel de agarose 1% e corridos com tampão de corrida *Running Buffer* 1X (75V, 400mA, ~45min) e verificados em UV, observando a presença e qualidade das duas bandas, 28S e 18S, com relação de 1,5/1. As imagens foram obtidas através do sistema de fotografia KODAK Molecular Imaging Software Version 4.0, 2-User e Eletronic UV Transilluminator Ultra. Lum. Inc..

3.6.3. Obtenção da cDNA a partir do RNA total

Amostras de 5,0 µg de RNA total extraído dos tecidos foram submetidos à reação de transcrição reversa com primers randômicos para a síntese de uma fita de DNA complementar ao RNAm (cDNA). Para isto, foi adicionado em cada amostra: 1 µL de H₂O DEPC, 4 µL de tampão da enzima (50mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), 2 µL DTT (10 mM), 1 µL mistura de dNTPs (0,5mM cada), 0,5 µL Random (0,3 µg/µL) e 1 µL da enzima Transcriptase Reversa (200U; Invitrogen®, EUA), em volume final de 8,5 µL, completos com H₂O DEPC. As amostras passaram por uma série de incubações, sendo 10 minutos a 25°C para ligação do Random, 1 hora a 42°C na presença de 1 µL da enzima para anelamento e extensão, 15 minutos a 70°C para desnaturação da enzima e fim da reação.

3.6.4. PCR para amplificação dos fragmentos dos genes do GLUT4, SOCS3, HIF-1α e β-actina

Resumidamente o protocolo de PCR a ser utilizado foi: alíquotas de 1 µL do produto final de RT-PCR (cDNA), juntamente com 10 pmol dos primers específicos para **GLUT4** Sense: 5'- CCCCTCCAGGGCAAAGGAT -3'; Antisense: 5'- TCCTGGAGGGGAACAAGAA - 3'; **SOCS3** Sense: 5'- TTCAGCATCTCTGTCGGAAGAC -3'; Antisense: 5'- CGGCAGCTGGGTGACTTT -3', **HIF-1α** Sense: 5'- CCCATCCATGTGACCATGAGG - 3'; Antisense: 5'- TCAGCACCAAGCACGTCATAGG - 3'; e da **β-actina**: Sense: 5' - ATGAAGATCCTGACCGAGCGTG - 3'; Antisense: 5' - CTTGCTGATCCACATCTGCTGG -3', sendo submetidas à amplificação em 24 µL de um

“mix” contendo 5,0 μL de tampão 10x Taq Polimerase (Invitrogen®), 1,5 μL de cada dNTPmix 10 mM, 1,5 μL de MgCl_2 50 mM, 0,125 μL da enzima Taq DNA Polimerase [5U/ μL] (Invitrogen®) e 15,875 μL de água Mili-Q autoclavada. As reações de PCR foram realizadas com um passo inicial de desnaturação do molde de cDNA a 95 °C por 2 min e posterior anelamento com temperaturas específicas para cada primer conforme padronização realizada, e extensão de 72°C por 45 s. Por fim, o material foi resfriado a 4°C até a realização da eletroforese em gel de agarose. As incubações foram realizadas em termociclador automático Techne TC-312.

Os produtos amplificados foram posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose-EtBr e visualizados com iluminação UV. As imagens foram adquiridas em equipamento de fotovideodocumentação (KODAK Molecular Imaging Software Version 4.0, 2-User e Eletronic UV Transilluminator Ultra. Lum. Inc) e para análise densitométrica das bandas obtidas foi utilizado o software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA), apropriado para este fim.

A expressão do RNAm para o gene GLUT4, SOCS3 E HIF-1 α foi normalizada pela expressão da β -actina (proteína constitutiva), calculada pela razão entre os valores da densitometria do gene de interesse e do gene constitutivo.

3.7. Quantificação de proteínas do transportador de glicose GLUT4

A quantificação da proteína GLUT4 das amostras foi feita por meio da técnica de Western Blotting.

3.7.1. Preparação das Amostras para o Western Blotting

Para a técnica de Western Blotting foi utilizado o músculo esquelético gastrocnêmio em membranas totais (MT). Para isso os tecidos foram centrifugados a 1000g durante 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi guardado e o precipitado ressuspenso em mesmo tampão (1/3 do volume inicial) e submetido novamente à centrifugação (1000g) por 10 minutos, a 4°C. Os dois sobrenadantes foram somados e então submetidos à uma ultracentrifugação a 150000g durante 75 minutos, a 4°C. O sedimento, correspondendo à fração MT, foi ressuspenso em 600µL de tampão de homogeneização e estocado a -20°C até a utilização⁴².

3.7.2. Método Lowry para dosagem de proteína

A concentração de proteína total das diferentes frações de membranas celulares foi avaliada através do método de LOWRY⁴³. Foram acrescentados em 100 µL de amostra, dois mL de solução C (solução A: Na₂CO₃ 189 mM, NaOH 100 mM, Tartarato de Na⁺ e K⁺ 0,7 mM adicionada de solução B: CuSO₄.5H₂O 16 mM, numa proporção de 50 volumes de solução A: 1 volume de solução B. Após 10 minutos de incubação a 370C, adicionou-se a solução de Folin Ciocalteau (75 µL). Após 30 minutos de incubação a 370C, a concentração de proteína foi avaliada por leitura em espectrofotômetro (670 nm), utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,05 a 1,0 mg / mL. Os valores de concentração protéica das amostras de frações de membranas foram aferidos nesta curva de calibração.

3.7.3. Western Blotting – Quantificação de proteína GLUT4

Conhecidas as concentrações protéicas das diferentes amostras de tecido, estas foram submetidas ao método de “Western Blotting” para a quantificação do transportador de glicose GLUT4. O método envolve os seguintes passos:

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O primeiro passo do Western Blotting consiste em submissão das amostras a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Através deste método, é possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades protéicas sejam perdidas, permitindo estudos posteriores nestas frações protéicas.

Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli e modificado por GARFIN⁴⁴, o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de empacotamento (“staging gel” - Acrilamida 5,8%; Bisacrilamida 0,16%; Tris 0,5M pH 6,8; EDTA 8mM; SDS 0,1% TEMED 0,05%; persulfato de amônio 0,06%) e o gel de separação (“resolving gel” - Acrilamida 9,7% Bisacrilamida 0,3%; Tris 1,5 M pH 8,9; EDTA 8mM; SDS 0,125%, TEMED 0,05% persulfato de amônio 0,05%).

Amostras de frações de membrana (20-30µg de proteína / lane, dependendo do tecido) foram solubilizadas em tampão de Laemmli (glicerol 15%, Tris 0,05M, Bromophenol Blue 0,05%, SDS 9%, 2-Mercaptoetanol 6%) e, então, submetidas a fervura durante 5 minutos. Após fervura as amostras foram resfriadas e aplicadas no sistema de corrida (gel).

A eletroforese vertical foi iniciada sob voltagem constante em 75 mV até que ocorresse o empacotamento da amostra, o que podia ser observado na transição dos dois géis (aproximadamente 1h e 30min). Posteriormente, foi aplicada uma corrente constante

de 55mA para a corrida no gel de separação (aproximadamente 4h e 30min), utilizando-se como tampão de corrida Tris 25 mM, Glicina 190 mM, SDS 0,1%, EDTA 2 mM, pH 8,3. Juntamente com as amostras sempre foi colocado um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares (marcadores), o que facilitava a localização da proteína desejada para o estudo.

Transferência eletroforética

Após a separação das frações protéicas em gel de poliacrilamida, foi realizada a transferência eletroforética dessas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE healthcare, AMERSHAM Biosciences, UK).

A transferência foi realizada sob corrente constante de 42mA, em temperatura de 40°C por 16 horas, utilizando-se como tampão de transferência Tris 12,5 mM, Glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8,3. A qualidade da transferência foi verificada corando-se o gel pós-transferência com azul brilhante de Comassie⁴⁵.

Imunodeteção (Immunoblotting) - ECL (Enhanced Chemiluminescence)

Após a transferência eletroforética, iniciou-se o processo de imunodeteção⁴⁶. Primeiramente, realizou-se um bloqueio inespecífico com leite desnatado – 23g de leite em 100ml de PBS 1X (NaCl 0,8%, Na₂HPO₄[12H₂O] 0,115%, KCl 0,02%, KH₂PO₄ 0,02%) durante 1 hora em temperatura ambiente e, em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo anti-GLUT4 (antisoro comercial de coelho - Chemicon International, Temecula, Califórnia) com diluição de 1:3000 em PBS 1X + BSA 8%), durante 3 horas a 37°C.

Posteriormente a membrana recebeu série de lavagens com 10 ml de solução de lavagem (PBS 1X + 0,1% Tween 20). Em seguida foi feita uma incubação com o anticorpo

secundário anti-IgG de coelho, marcado com peroxidase (HRP), diluído 1:6000, em solução bloqueadora (1g de leite em pó + 20 ml de PBS 1X + 0,05% de Tween 20) durante 1 hora. A membrana foi lavada vigorosamente com solução de lavagem e colocada em contato com solução de detecção (H₂O destilada + Luminol + Ác. P-Cumárico + Tris 1M [pH 8,5] + Peróxido de Hidrogênio) por 1 minuto.

Por fim, a membrana foi exposta a Hyperfilm® (IGF – Corporation, New Jersey, USA) por períodos de 1,5 a 3 minutos para detecção das bandas resultantes. Após este período o filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora (KODAK), sendo evidenciados os “blots” correspondentes à proteína transportadora GLUT4.

Expressão dos resultados

O Filme foi fotografado por uma câmera do aparelho de fotodocumentação Gel Logic 100 (Kodak Molecular Imaging, EUA), e as imagens foram analisadas por densitometria utilizando-se o software Scion Image for Windows (Scion Corporation, EUA).

A intensidade dos “blots” e os resultados em cada membrana foram normalizados considerando-se 100% o valor obtido pelo grupo controle (CG ou CL). Os resultados obtidos a partir desta análise densitométrica foram então expressos em:

- Conteúdo total de GLUT4 dividido por grama de peso tecidual que reflete a capacidade do tecido em depurar a glicose sanguínea (UA/g de tecido);

3.8. Análise dos Dados

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM. Para comparação das médias foi utilizado o teste ANOVA one-way, paramétrico, com pós-hoc (Bonferroni) por meio do software GraphPad InStat Version 3.01. Os valores de GLUT4 foram correlacionados com SOCS3 e HIF1 α , correlação de Pearson por meio de gráfico de dispersão, após testada a normalidade dos dados com o teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov usando o software SPSS 17.0 Statistics. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando o valor de P fosse menor que 0,05.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Resultados das Mães

4.1.1. Análise do Peso

O peso das ratas prenhes foi analisado semanalmente durante os diferentes períodos reprodutivos (pré-gestação, gestação e lactação). Na Tabela 1, são mostrados os pesos teciduais e os pesos corpóreos, pode-se observar que no grupo FG o tecido adiposo estava 26% menor em relação ao seu controle, e não foi detectado tecido adiposo nas ratas lactantes. Já os demais tecidos não apresentaram diferenças estatísticas nos pesos entre os grupos estudados. Observou-se também que, a exposição à fumaça de cigarro não alterou os pesos corpóreos durante a pré-gestação (Fig. 05a), porém o peso das ratas FG foi menor em relação ao grupo CG e, durante a lactação as ratas do grupo FL tiveram peso menor durante os 21 dias analisados (Fig. 05 b,c).

Tabela 1 – Peso corpóreo e tecidual das ratas prenhes no momento do sacrifício.

	CG	CL	FG	FL
Músc.	1,37±0,07	1,09±0,06	1,30±0,10	1,15±0,05
Gastrocnêmio (g)				
Tec. Adiposo (g)	3,32±0,23	nd	2,38±0,33*	nd
Fígado (g)	10,05±0,52	9,83±0,41	9,01±0,76	8,33±1,43
Coração (g)	0,80±0,02	0,83±0,04	0,78±0,03	0,81±0,02

Os valores são expressos em gramas (g), n=8-10 animais por grupo, * $P < 0,05$ vs CG. ANOVA e Bonferroni. nd = não detectado. CG: controle gestação; CL: controle lactação; FG: fumante gestação; FL: fumante lactação.

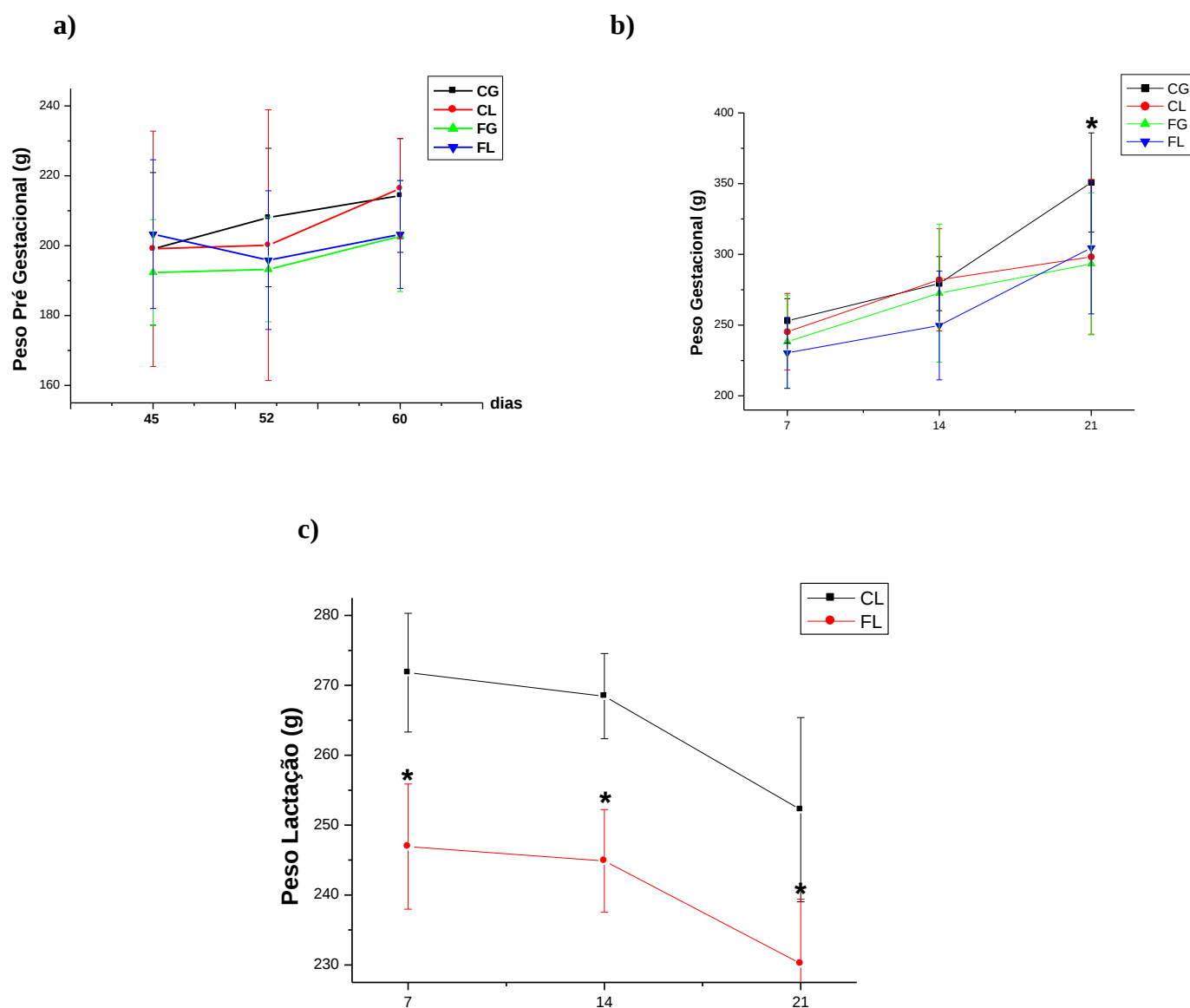


Fig. 05 – a) Peso corpóreo médio das ratas durante o período pré gestacional. b) Peso corpóreo médio das ratas durante o período gestacional, * $P < 0,05$ CG vs CL, FG, FL. c) Peso corpóreo médio das ratas durante o período da lactação, * $P < 0,001$ vs CL. $n=8-10$ animais por grupo. ANOVA e Bonferroni. Os valores são expressos em gramas (g). CG: controle gestação; CL: controle lactação; FG: fumante gestação; FL: fumante lactação.

4.1.2. Análise da Glicemia

A Fig. 06 representa os níveis plasmáticos da glicemia de jejum das ratas no momento do sacrifício e pode-se observar que os grupos submetidos à fumaça de cigarro apresentaram valores estatisticamente maiores em relação aos controles.

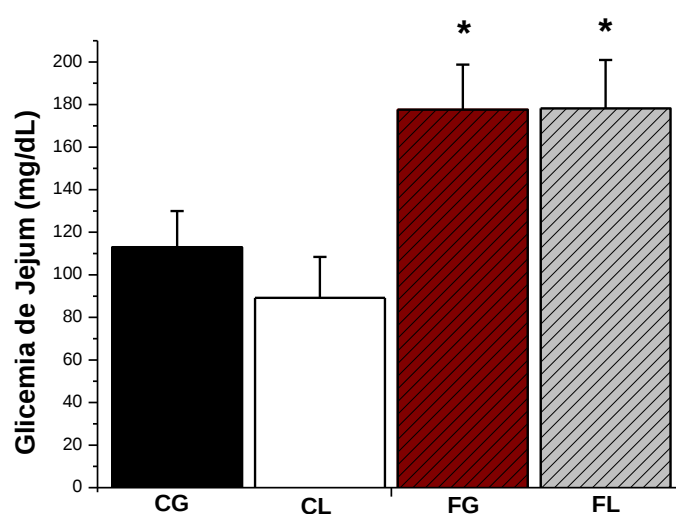


Fig. 06 – Níveis plasmáticos da glicemia de jejum (6-8h), em mg/dL. n=8-10 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs. CG e CL. ANOVA e Bonferroni. CG: controle gestação; CL: controle lactação; FG: fumante gestação; FL: fumante lactação.

4.1.3. Análise da expressão do RNAm do GLUT4, SOCS3 e HIF-1 α , e do conteúdo protéico do GLUT4

Na Fig. 07 a,b, observa-se a expressão gênica e protéica do GLUT4 no músculo gastrocnêmio das ratas e, pode-se verificar que os grupos FG e FL obtiveram conteúdo protéico 48,38% e 39,94% menor em relação aos controles, respectivamente, sem alterações estatísticas na expressão gênica do transportador.

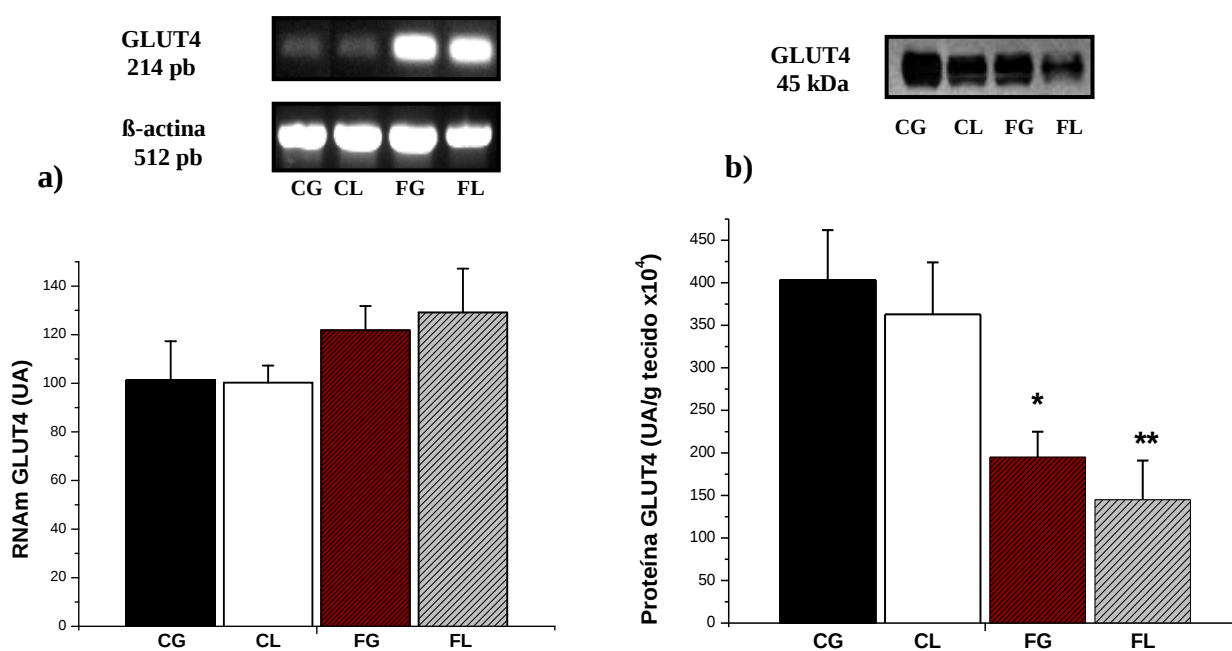


Fig. 07 – a) Expressão de RNAm do GLUT4 com seus valores descritos em unidades arbitrárias (UA) e corrigidos pela expressão do gene da proteína constitutiva β -actina e, imagens representativas dos respectivos produtos de RT-PCR. b) Conteúdo protéico do GLUT4, com imagens da radiografia obtida pelo ensaio de Western Blotting. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias por grama de tecido (UA/g tecido $\times 10^4$) considerando CG e CL como 100% para os grupos FG e FL, respectivamente. * $P < 0,05$ vs CG e ** $P < 0,01$ vs CL, $n = 6-9$ animais por grupo. ANOVA e Bonferroni. CG: controle gestação; CL: controle lactação; FG: fumante gestação; FL: fumante lactação.

A Fig. 08 a,b representa os valores da expressão gênica das proteínas SOCS3 e HIF-1 α , respectivamente. Pode-se observar que não há diferença na expressão gênica de SOCS3 e de HIF 1 α , porém se nota uma tendência para maiores valores nos grupos de mães que foram expostas à fumaça de cigarro comparadas aos controles, com maior valor no grupo FL, onde o gene estava 33% mais expresso em relação à CL.

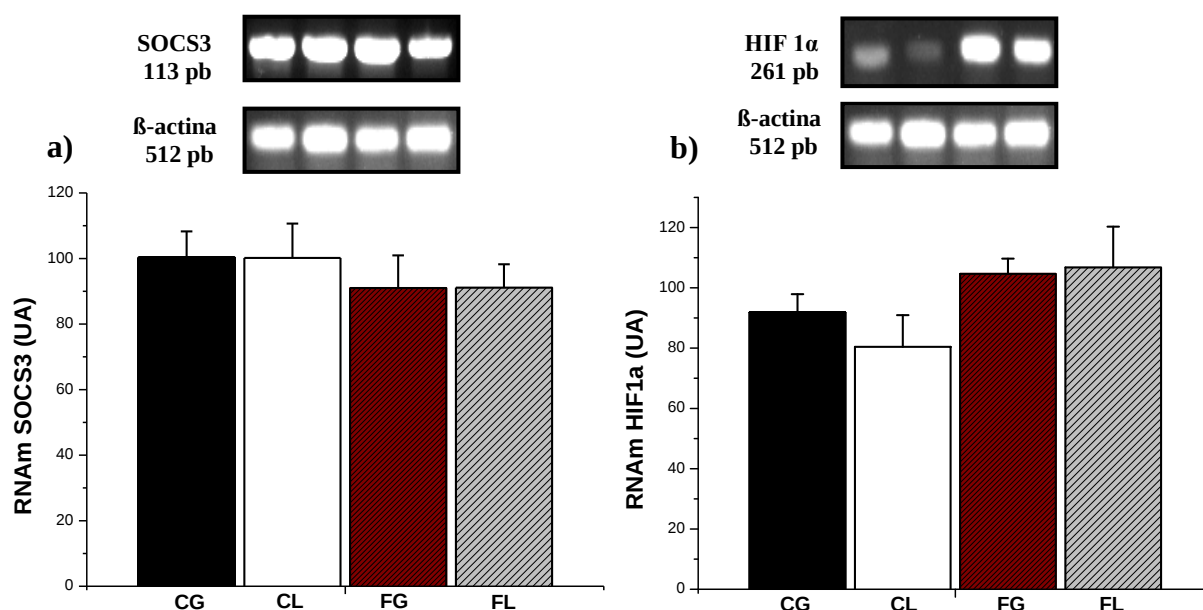


Fig. 08 – a) Expressão de RNAm de SOCS3. b) Expressão de RNAm de HIF-1 α . Os valores foram descritos em unidades arbitrárias (UA) e corrigidos pela expressão do gene da proteína constitutiva β -actina e, imagens representativas dos respectivos produtos de RT-PCR. n=7-9 animais por grupo. ANOVA e Bonferroni. CG: controle gestação; CL: controle lactação; FG: fumante gestação; FL: fumante lactação.

4.1.4. Análise da correlação entre a expressão do RNAm de GLUT4, SOCS3 e HIF-1 α

As figuras 09 e 10 representam a correlação entre o RNAm de GLUT4 e HIF-1 α e SOCS3, respectivamente, o grupo FL mostrou correlação positiva entre os genes do transportador de glicose e o fator transcricional induzido por hipóxia 1 α , entretanto não houve correlação entre os genes de GLUT4 e SOCS3.

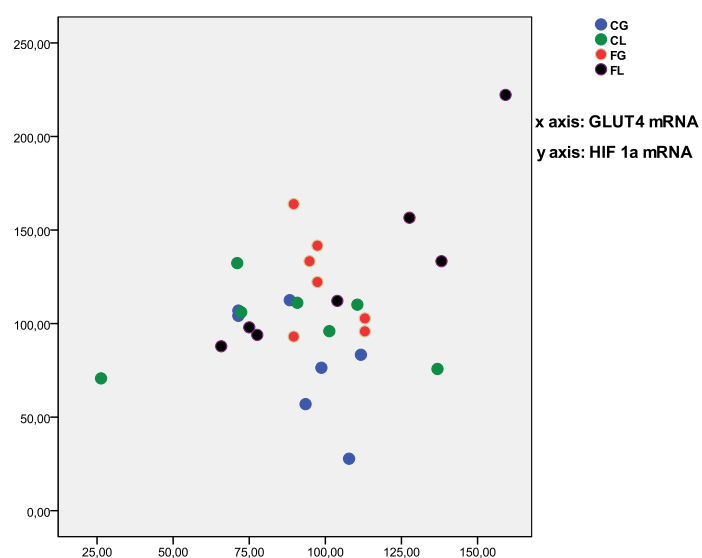


Figura 09 – Correlação entre a expressão do RNAm de GLUT4 e HIF 1 α . $P < 0,004$ e $r = 0,91$ entre os animais dos grupos FL. $n = 7-9$ animais. Correlação de Pearson e teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov.

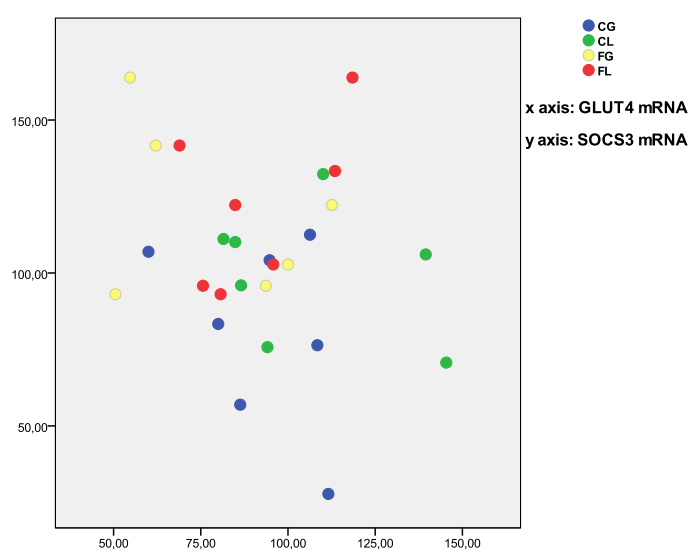


Figura 10 – Correlação entre a expressão do RNAm de GLUT4 e SOCS3. $n = 7-9$ animais. Correlação de Pearson e teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov.

4.2. Resultados das Proles

4.2.1. Análise do Peso

Nessa mensuração não houve divisão dos animais por sexo devido à impossibilidade de distinção, sendo então divididas em proles de mães não fumantes (Pnf) e proles de mães fumantes (Pf). O peso das proles foi analisado em três momentos: ao nascer, no primeiro mês e no segundo mês (Fig. 11).

Observou-se diferença estatística em todos os momentos analisados, ao nascer, sendo que a prole de mães fumantes apresentou peso 13,4% menor em relação à prole de mães não fumantes. No primeiro mês de vida observou-se peso 20% menor da prole de mães fumantes em relação ao peso da prole de mães não fumantes e, no segundo mês de vida o peso da prole de mães fumantes foi 12,1% menor em relação ao peso da prole de mães não fumantes.

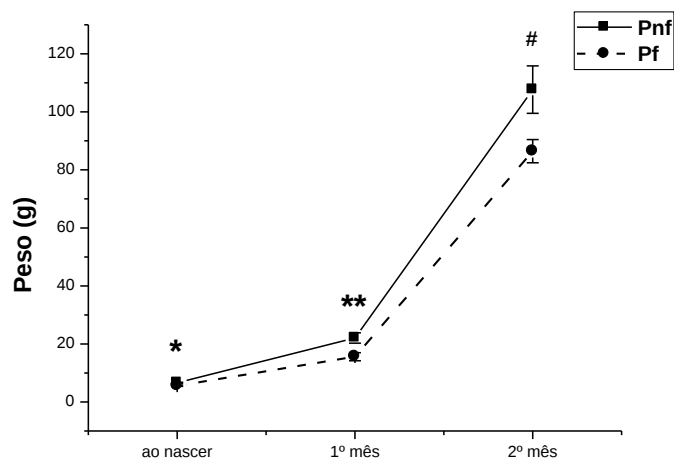


Fig. 11 – Evolução do peso médio ao nascer, no primeiro e no segundo mês de vida das proles de mães fumantes e não fumantes. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM, expressos em gramas (g), $n=10$ animais por grupo. * $P<0,001$, ** $P<0,01$ e # $P<0,05$ vs. Pnf. ANOVA e Bonferroni. Pnf: prole de ratas não fumantes; Pf: prole de ratas fumantes.

A Tabela 2 apresenta os pesos teciduais nas proles macho e fêmea. O tecido adiposo branco periepídídimo na prole macho de ambos os grupos de mães lactantes, fumantes e não fumantes esteve menor quando comparados às proles que foram adotadas (Pcg e Pfg) e, interessante, em proles fêmeas este tecido não foi detectado. Não houve alteração estatística no peso dos demais tecidos analisados.

Tabela 2 – Peso dos tecidos extraídos das proles macho e fêmea no momento do sacrifício.

GRUPO	Músculo	Tecido	Fígado (g)	Coração (g)
	Gastrocnêmio (g)	Adiposo (g)		
Pcg (M)	0,99±0,03	1,32±0,07	7,35±0,18	0,65±0,02
Pcg (F)	0,90±0,03	—	7,23±0,31	0,57±0,05
Pcl (M)	0,76±0,04	0,91±0,04*	6,27±0,23	0,53±0,09
Pcl (F)	0,73±0,02	—	5,53±0,45	0,49±0,02
Pfg (M)	0,94±0,06	1,17±0,1	6,98±0,96	0,55±0,04
Pfg (F)	0,72±0,02	—	5,17±0,42	0,48±0,02
Pfl(M)	0,73±0,08	0,89±0,11*	5,45±0,70	0,48±0,04
Pfl (F)	0,58±0,06	—	4,43±0,70	0,42±0,02

Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) expressos em gramas (g), n=7-10 animais por grupo, * $P<0,05$ vs Pcg e Pfg. ANOVA e Bonferroni. Pcg: prole de controle gestação; Pcl: prole de controle lactação; Pfg: prole de fumante gestação; Pfl: prole de fumante lactação.

4.2.2. Análise de Glicemia

Na Fig 12 observa-se um valor 57% e 65% maior nas glicemias de jejum das proles macho das mães fumantes gestação e lactação, respectivamente, sem alterações estatísticas nas proles fêmeas.

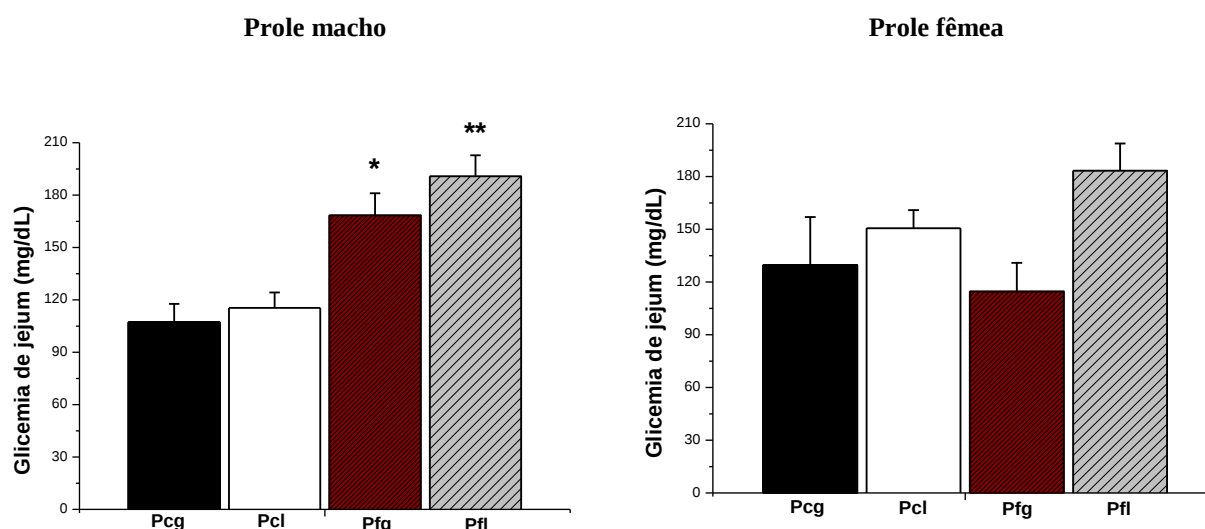


Fig. 12 – Níveis plasmáticos da glicemia de jejum (6-8h), em mg/dL das proles macho e fêmea. n=5-10 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs. Pcg e ** $P < 0,001$ vs. Pcl. ANOVA e Bonferroni. Pcg: prole de controle gestação; Pcl: prole de controle lactação; Pfg: prole de fumante gestação; Pfl: prole de fumante lactação.

4.2.3. Análise da expressão de RNAm de GLUT4, SOCS3 e HIF-1 e do conteúdo protéico de GLUT4 em prole macho e fêmea.

4.2.3.1. Prole Fêmea

A Fig. 13 – a, b - representa a expressão gênica e o conteúdo protéico de GLUT4 em músculo gastrocnêmio das proles fêmea, pode-se observar que nos grupos das proles expostas à fumaça de cigarro a expressão de RNAm GLUT4 foi 25% e 33% menor em relação à prole de mães controles, respectivamente. Apesar de não apresentar diferenças estatísticas no conteúdo protéico do transportador entre os grupos expostos e não-expostos à fumaça de cigarro, nota-se uma modulação de acordo com o período reprodutivo em que a mãe foi sacrificada, sendo que apresentaram maior conteúdo protéico as proles cujas mães sobreviveram até o final da lactação Pcl e Pfl). A expressão de SOCS3 não sofreu alteração

entre os grupos analisados, porém a expressão de HIF1 α estava 30% e 66% menos expresso nas proles Pfg e Pfl (Fig. 14 a,b).

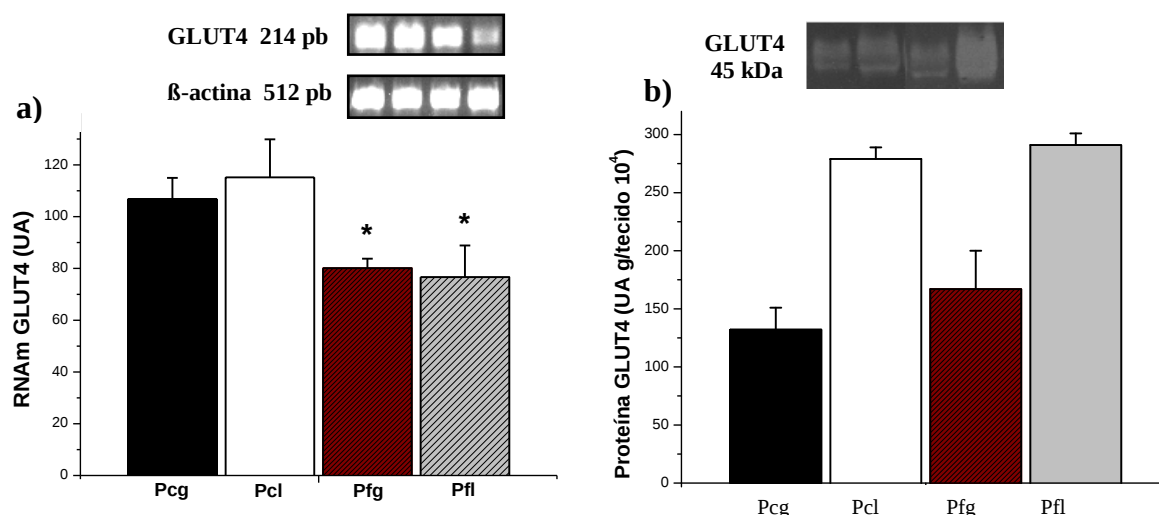


Fig. 13 - **a)** Análise da expressão de RNAm de GLUT4 representados em unidades arbitrárias (UA), com imagens representativas dos produtos de RT-PCR. **b)** Conteúdo protéico do GLUT4, com imagens da autorradiografia obtida pelo ensaio de Western Blotting, expresso em unidades arbitrárias por grama de tecido (UA/g tecido $\times 10^4$). $n=7-10$ animais por grupo. $*P < 0,05$ vs. Pcg e Pcl, respectivamente. ANOVA e Bonferroni como pós teste. Pcg: prole de controle gestação; Pcl: prole de controle lactação; Pfg: prole de fumante gestação; Pfl: prole de fumante lactação.

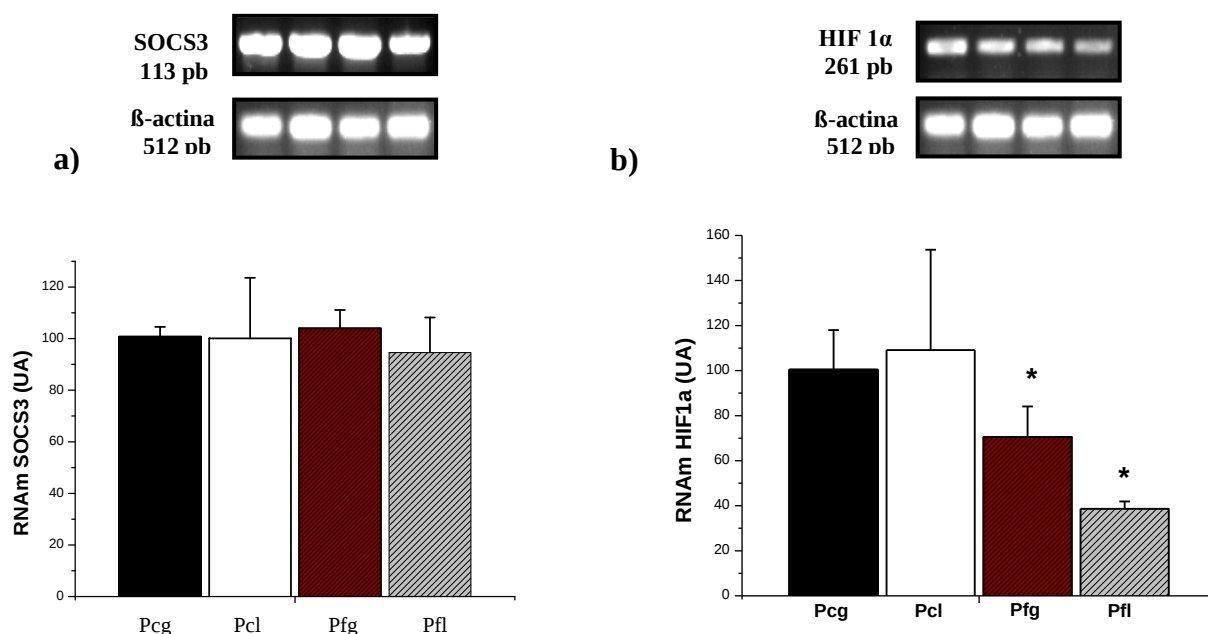


Fig. 14 - **a)** Análise da expressão de RNAm de SOCS3. **b)** Análise da expressão de RNAm de HIF-1α. Os valores foram representados em unidades arbitrárias (UA), com imagens representativas dos produtos de RT-PCR dos genes do SOCS3, HIF1α e β-actina. n=9-10 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs. Pcg e Pcl, respectivamente. ANOVA e Bonferroni como pós teste.

4.2.3.2. Prole Macho

A Fig. 15 – a, b representa a expressão gênica e o conteúdo protéico de GLUT4 em músculo gastrocnêmio das proles macho. A expressão gênica do transportador está menor nas proles cujas ratas foram expostas à fumaça de cigarro, sendo 17% menor em Pfg e 66% em Pfl, apesar de não apresentar diferenças estatísticas no conteúdo protéico do transportador nota-se uma tendência ao aumento nas proles das ratas expostas à fumaça em relação aos grupos controles. A expressão de SOCS3 não sofreu alteração entre os grupos analisados, porém a expressão de HIF1α estava 30% e 66% menor nas proles Pfg e Pfl (Fig. 16 a,b).

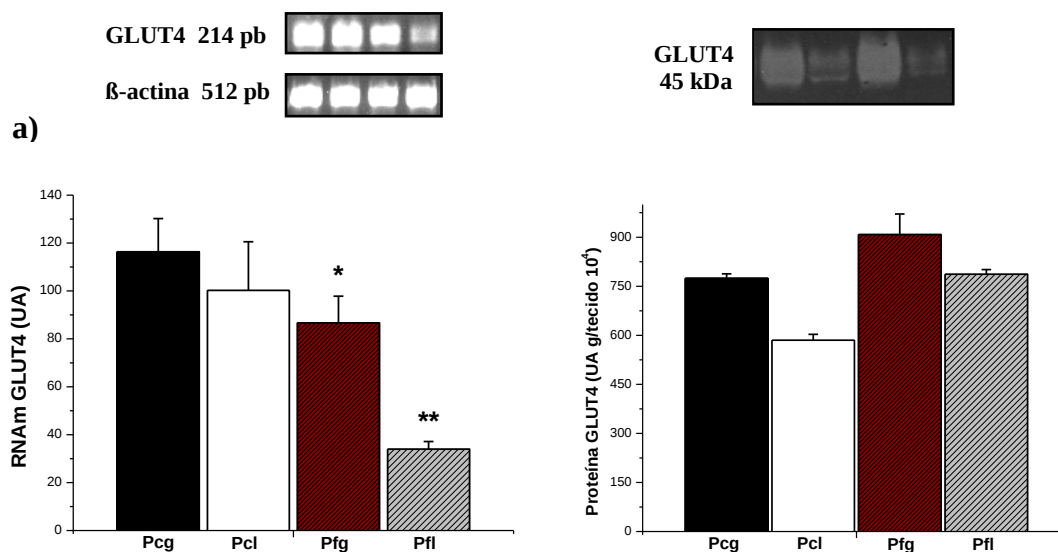


Fig. 15 - **a)** Análise da expressão de RNAm de GLUT4 expressos em unidades arbitrárias (UA), com imagens representativas dos produtos de RT-PCR. **b)** Conteúdo protéico do GLUT4, com imagens da radiografia obtida pelo ensaio de Western Blotting expressas em unidades arbitrárias por grama de tecido (UA/g tecido $\times 10^4$) considerando Pcg e Pcl como 100% para os grupos FG e FL, respectivamente. $n=6-10$ animais por grupo. $*P<0,05$ vs. Pcg e $**P<0,001$ vs. Pcl, respectivamente. ANOVA e Bonferroni como pós teste. Pcg: prole de controle gestação; Pcl: prole de controle lactação; Pfg: prole de fumante gestação; Pfl: prole de fumante lactação.

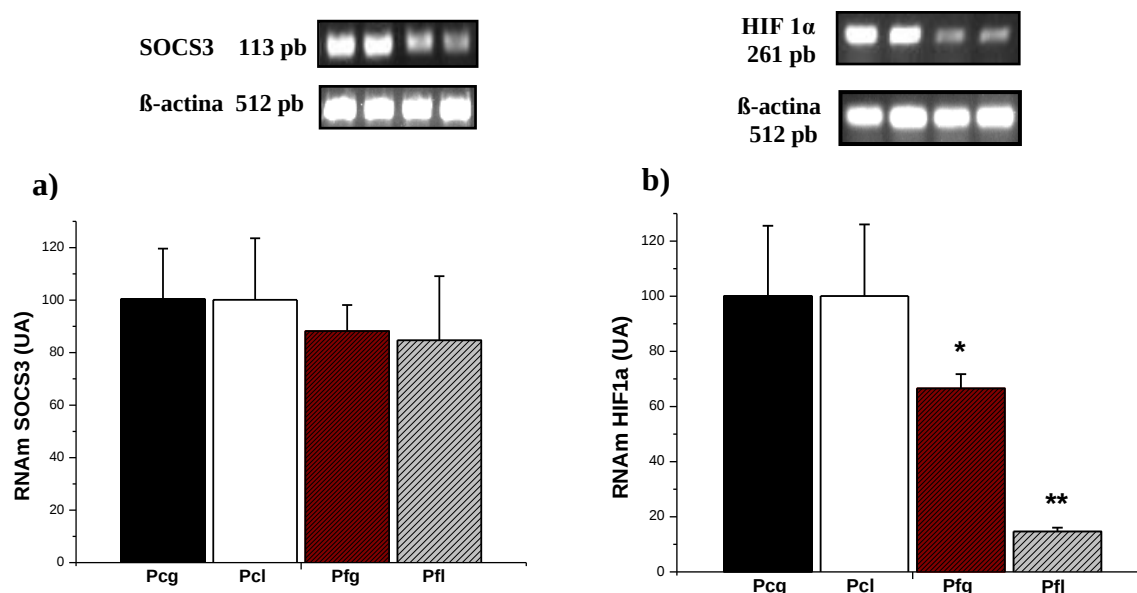


Fig. 16 - **a)** Análise da expressão de RNAm de SOCS3. **b)** Análise da expressão de RNAm de HIF-1 α . Os valores foram expressos em unidades arbitrárias (UA), com imagens representativas dos produtos de RT-PCR dos genes de SOCS3, HIF1 α e β -actina. n=7-10 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs. Pcg e ** $P < 0,01$ vs. Pcl, respectivamente. ANOVA e Bonferroni como pós teste. Pcg: prole de controle gestação; Pcl: prole de controle lactação; Pfg: prole de fumante gestação; Pfl: prole de fumante lactação.

4.2.4. Análise da correlação entre a expressão de RNAm de GLUT4, SOCS3 e HIF-1 α

4.2.4.1. Prole Fêmea

A Figura 17 a,b, representam a correlação entre o RNAm de GLUT4, HIF-1 α e SOCS3 em prole fêmea, os resultados não evidenciaram correlação entre os genes analisados.

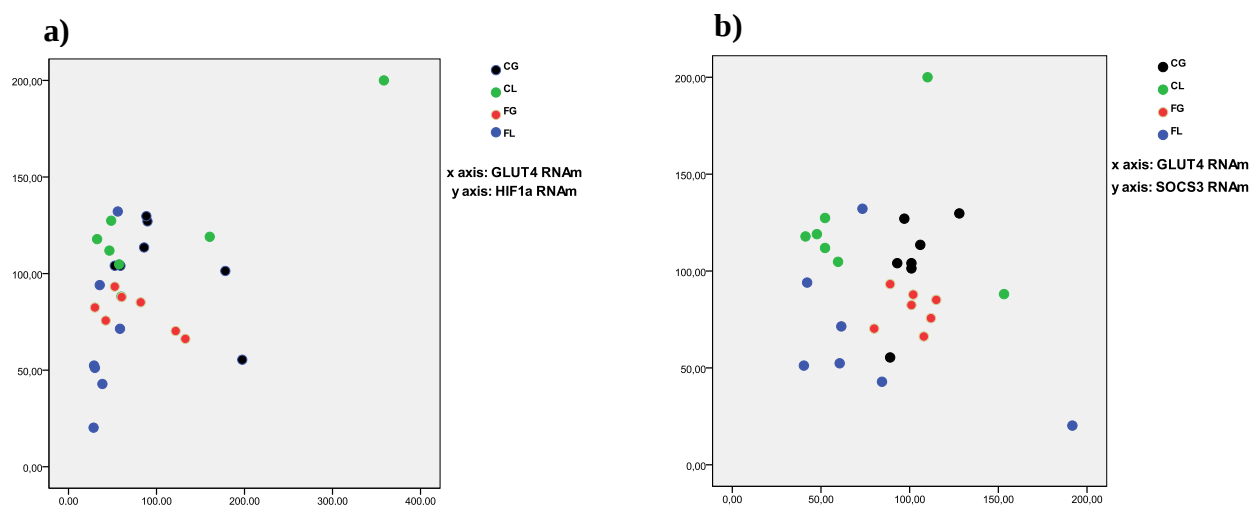


Figura 17 – a) Correlação entre a expressão do RNAm de GLUT4 e HIF1 α . b) Correlação entre a expressão do RNAm de GLUT4 e SOCS3. n = 7-9 animais. Correlação de Pearson e teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov.

4.2.4.2. Prole Macho

A Figura 18 a,b, representam a correlação entre o RNAm de GLUT4, HIF-1 α e SOCS3 em prole macho, os resultados não evidenciaram correlação entre os genes analisados.

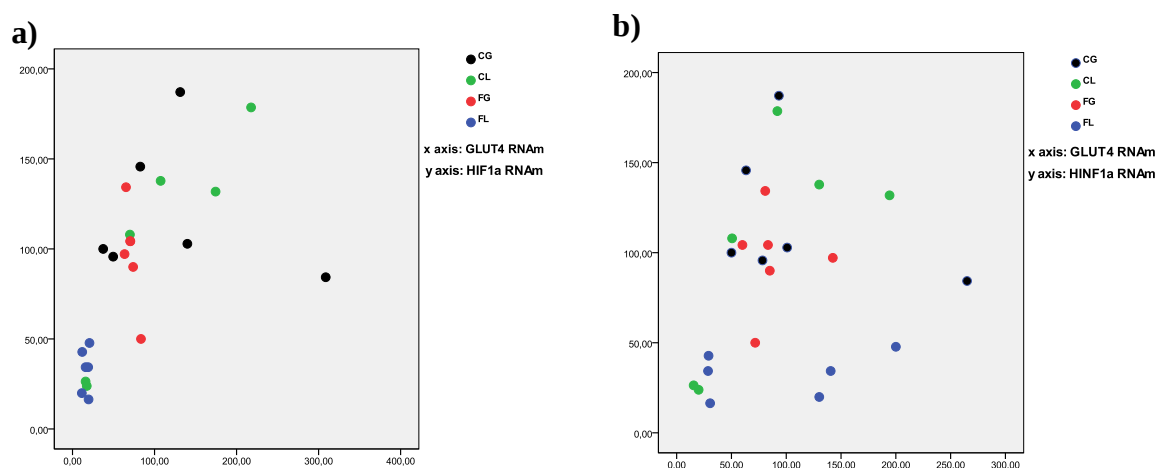


Figura 18 – a) Correlação entre a expressão do RNAm de GLUT4 e HIF1 α . b) Correlação entre a expressão do RNAm de GLUT4 e SOCS3. n = 7-10 animais. Correlação de Pearson e teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov.

5. Discussão

A literatura tem evidenciado os malefícios do fumo durante a gestação, tanto para a saúde materna quanto para a saúde fetal. No presente estudo foi enfatizado o efeito da exposição à fumaça de cigarro na homeostasia glicêmica, parâmetros morfométricos e expressão da proteína GLUT4 envolvida no transporte da glicose insulino-mediado em músculo esquelético de ratas durante a prenhez e a lactação e em sua prole, investigando o envolvimento de dois mecanismos: inflamação, por meio da proteína supressora da sinalização de citocinas, SOCS3; e hipóxia causada pela exposição à fumaça de cigarro, por meio do fator transcricional induzido por hipóxia 1α – HIF1 α .

De acordo com os resultados obtidos, durante os períodos reprodutivos as ratas expostas à fumaça de cigarro apresentaram peso corpóreo menor e, quando analisados os pesos teciduais, o mesmo acontece com o tecido adiposo branco no grupo FG sugerindo a ação do fumo sobre o peso e a redistribuição de gordura corporal mediado pela nicotina⁵. A inalação de nicotina promove a elevação aguda da concentração no cérebro de alguns neurotransmissores, como dopamina e serotonina, substâncias inibidoras da ingestão de alimentos⁴⁷. Embora no presente estudo, não se tenha feito o controle da ingestão alimentar, uma das prováveis hipóteses para a redução do peso das ratas expostas tenha ocorrido em função da redução de apetite. Outro aspecto a ser considerado é o efeito direto da nicotina sobre o metabolismo do tecido adiposo, ocorrendo maior oxidação de lipídeos nos fumantes em relação aos não fumantes, conforme observado por Filozof, 2004⁴⁸ e Ferrara, 2001⁴⁹.

Como descrito na literatura, a ausência de tecido adiposo durante o período de lactação tanto em ratas submetidas à fumaça de cigarro como em ratas não expostas como o

observado neste estudo, ocorre porque o tecido adiposo é armazenado na gestação e mobilizado durante a lactação, para formação do leite⁵⁰, esse achado está de acordo com o observado por Stuebe e Rich-Edwards (2009)⁵¹, em que roedores apresentavam armazenamento do tecido adiposo durante a gestação, o qual foi mobilizado durante a lactação. Hamosh⁵², em 1970, também observou algo semelhante e demonstrou mudanças regionais na lipase lipoprotéica com atividade favorável para a deposição de gordura em ratos. A deposição de gordura aumentou durante a gravidez, mas com a lactação, o tecido adiposo foi degradado para a formação de leite.

Além de alterar o peso e a distribuição da gordura corporal o tabagismo também exerceu efeito prejudicial na homeostasia glicêmica, pois os grupos de ratas submetidas à fumaça de cigarro apresentaram valores aumentados, enquanto que as ratas não expostas tiveram os valores de glicemia de jejum próximos do esperado. O mecanismo celular responsável pela hiperglicemia encontrada é desconhecido, mas provavelmente acontece pela associação de aumentos das concentrações plasmáticas materna de esteróides sexuais, prolactina, lactogênio placentário e corticosteróides⁵ e ativação do sistema nervoso simpático com a liberação de catecolaminas que são reconhecidas por reduzir a captação de glicose insulino-mediada e aumentar produção hepática de glicose⁵³. Sinzato⁵⁰ em 2008, demonstrou ainda que ratas diabéticas expostas à fumaça de cigarro apresentavam hiperglicemia quando comparadas a ratas diabéticas não expostas, sugerindo que o tabagismo contribui para o prejuízo da homeostasia glicídica mesmo quando o diabetes já está instalado.

Os animais expostos à fumaça não apresentaram diferenças significativas na expressão do gene GLUT4, contudo houve expressiva redução no conteúdo protéico de GLUT4 tanto na prenhez como na lactação. É sabido que os níveis deste transportador em

músculo esquelético não mudam em mulheres durante a gestação ou em mulheres com diabetes gestacional⁵⁰ e que, durante a lactação ocorre prejuízo na expressão e/ou translocação de GLUT4 devido à degradação do tecido adiposo liberando de ácidos graxos livres que possuem papel crucial na gênese da alteração da captação de glicose^{54,55}.

Logo, a associação desses períodos com a exposição à fumaça de cigarro foi determinante para prejudicar a tradução e/ou translocação de GLUT4, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não está bem elucidado. A expressão gênica de SOCS3 e HIF1 α também não sofreu modulação expressiva, porém houve correlação positiva entre GLUT4 e HIF1 α , o mesmo não ocorreu quando analisados GLUT4 e SOCS3, sinalizando uma provável influência de HIF1 α sobre a expressão de GLUT4 causado pela hipóxia intermitente da exposição à fumaça durante o período de gestação e lactação simultaneamente.

Royer, 2000⁵⁶, demonstraram em seu estudo aumento na expressão dos genes GLUT1 e GLUT3 e do HIF1 α em cérebro de ratos em desenvolvimento durante hipóxia gestacional, sugerindo influência deste fator transcricional na regulação do gene transportador de glicose. Regazzetti, 2009⁵⁷, demonstraram que a hipóxia inibe a sinalização da insulina em adipócitos através do HIF1 α por aumento de adipocinas e citocinas pró inflamatórias (IL-1 β e IL-6), em ratos obesos. Porém, não há consenso sobre quais os mecanismos intracelulares que efetivamente podem ocasionar alteração na homeostasia glicídica nos diferentes modelos estudados.

Mais marcantes ainda foram os resultados encontrados nas proles, observa-se que as proles de ratas expostas à fumaça de cigarro durante a gestação e lactação possuem menor peso ao nascer, assim permanecendo até as oito semanas de vida em que foram analisadas. Além do peso corpóreo, foi notado menor peso tecidual em tecido adiposo branco

periepididimal nos machos. O mesmo acontece na prole fêmea no tecido muscular, porém, não se constatou a presença de tecido adiposo branco periuterino nos grupos.

Esses dados estão de acordo com os achados de Simpson⁵⁸, estudo pioneiro a associar o efeito da exposição materna à fumaça de cigarro ao baixo peso ao nascer dos filhotes. E Nelson⁵⁹ e Ng⁶⁰, que além de verificarem o baixo peso ao nascer observaram que membros anteriores e posteriores, cauda e coluna espinal e tecidos cardíaco, hepático e renal estavam diminuídos. Os mecanismos fisiopatológicos que ocasionam retardo no desenvolvimento desses animais já estão bem estabelecidos na literatura, e, provavelmente, seja o mesmo aventado para humanos, ou seja, hipóxia fetal sendo originada por duas vias independentes, porém, aditivas: o efeito agudo da liberação de catecolaminas induzido pela nicotina que resulta em hipóxia fetal episódica e ocorre devido à vasoconstrição materna e perfusão uterina reduzida, e o aumento prolongado dos níveis de COHb fetal, resultando em hipoxemia fetal persistente⁶¹. Além disso, modificações morfológicas maternas e placentárias poderiam resultar em efeitos hormonais e tróficos sobre o feto⁶².

Apesar de estar bem estabelecido na literatura que filhos de mães fumantes têm baixo peso ao nascer e retardo no ganho de peso, não há relatos de comparação entre esses resultados com a quantidade de tecido adiposo branco, que estava diminuído em machos de ratas expostas e ausente em fêmeas de todos os grupos. Alguns estudos vêm mostrando que o hormônio leptina é passado pelo cordão umbilical da mãe para o feto durante a gestação, porém as concentrações séricas deste hormônio estiveram mais elevadas no sexo feminino em relação ao sexo masculino^{63,64}. Sabendo-se dos efeitos anorexigênicos da leptina, isso poderia justificar a ausência de tecido adiposo em fêmeas que apresentariam menor ingestão alimentar, do que em machos, outra provável hipótese poderia ser a utilização de ácidos graxos como fonte para produção dos hormônios sexuais femininos⁶⁵.

Além de alterações no peso corpóreo e tecidual dos animais estudados também se observou alteração na glicemia de jejum. O perfil glicêmico da prole macho estava aumentado nos grupos fumantes em relação ao seu controle. Esses dados assemelham-se aos achados de Bruin⁶⁶, que verificou, em modelo animal do sexo masculino, prejuízo na homeostasia glicídica da prole exposta à nicotina durante a gestação e lactação.

Sabe-se que o tabagismo altera o metabolismo celular em vários aspectos e a literatura indica que o fumo está associado a um quadro de resistência à insulina²⁶, assim a alteração nos níveis séricos de glicose ocorre, pois a nicotina atinge o feto através da placenta e se concentra no sangue fetal com níveis 15% maiores que os níveis maternos⁶⁷, e também é eliminada no leite⁶⁸ causando hipoxemia fetal⁶¹, diminuindo ou retardando a absorção da insulina e provocando aumento na secreção de cortisol e hormônio do crescimento, ambos hiperglicemiantes⁶⁹. Modelos animais foram desenvolvidos para simular a hipóxia fetal, produzindo retardo do crescimento intra-uterino^{70,71} podendo determinar a ligação entre eventos intra-uterinos com o fenótipo adulto do concepto.

É sabido que a hipóxia pode alterar a distribuição subcelular do GLUT4⁷¹ e que a nicotina resulta em hipóxia fetal⁶¹. No presente estudo, fica claro que a expressão gênica de GLUT4 está prejudicada nas proles de mães expostas à fumaça de cigarro, em ambos os sexos, enquanto que o conteúdo protéico do transportador não apresentou alteração significativa. Isso sugere que de alguma maneira, acreditando ser consequência de período de grande desenvolvimento corpóreo e, portanto, necessidade maior de aporte energético, as proles apresentaram uma modulação positiva pós-transcricional do gene do GLUT4, sem prejuízo na expressão da proteína fundamental para obtenção do substrato. Outros estudos já relacionaram ausência de correlação entre conteúdo de RNAm e de proteína em diferentes modelos animais^{72, 73}.

O mecanismo até hoje utilizado para explicar a alteração no metabolismo glicídico e na expressão de GLUT4 é que durante hipóxias intermitentes há aumento de expressão de um fator transcricional importante na regulação do gene de GLUT4, o HIF1 α . É bem relatada na literatura a atuação do fator induzido por hipóxia HIF-1 α sobre aumento de transcrição de GLUT4 em células musculares tanto em condições hipoxêmicas como durante atividade contrátil⁷⁴.

Contrariamente a estes dados, ambas as proles de ratas expostas à fumaça de cigarro apresentaram redução na expressão de GLUT4, conjuntamente a esse dado a expressão de HIF1 α foi significativa menor em proles cujas mães foram expostas, sem alteração na expressão de SOCS3. Porém, quando esses dados foram correlacionados com a expressão do transportador nenhum dos genes apresentaram correlação, sugerindo que nem a inflamação sistêmica nem a hipóxia ocasionada pelo tabagismo tenha influenciado no mecanismo transcricional de GLUT4.

Pesquisas com animais têm sido realizadas no estudo da ação do fumo sobre muitas variáveis^{56,57,75,76}, no entanto a associação entre exposição à fumaça de cigarro durante a gestação e a lactação e a expressão de GLUT ainda é pouco investigada. Diante dos achados acima, pode-se sugerir que o ambiente pré e pós natal modificam a fisiologia tanto da mãe como do concepto através de um processo conhecido como "programação", que implica em mudanças adaptativas nos padrões de expressão gênica que ocorrem em resposta a um agente estressor⁷⁷. Este estudo evidenciou que a exposição de ratas à fumaça de cigarro, durante a gestação e lactação, acarreta prejuízos na saúde materna bem como influencia no desenvolvimento da prole desde o nascimento até uma fase mais tardia.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

A exposição à fumaça de cigarro durante a prenhez e lactação modula diferencialmente a expressão do transportador de glicose GLUT4 em músculo esquelético, sem que haja inflamação local, porém altera a glicemia de jejum e parâmetros morfométricos de ratas e sua prole. A maior expressão do fator transcricional HIF1 α em músculo esquelético das ratas fumantes parece estar envolvida na regulação do gene do GLUT4 o que não ocorre na prole, sugerindo o efeito “programming” sobre os mesmos.

7. Referências

1. Leturque A, Ferre P, Burnol AF, Kande J, Maulard P, Girard J. Glucose utilization rates and insulin sensitivity in vivo in tissues of virgin and pregnant rats. *Diabetes* 1986,35:172-177.
2. Ferre P, Burnol AF, Leturque A, Terretaz J, Penicaud L, Jeanrenaud B, et al. Glucose utilization in vivo and insulin-sensitivity of rat brown adipose tissue in various physiological and pathological conditions. *Biochem J* 1986,233:249-252.
3. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin resistance and insulin release in non-obese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1991,165:1667–1671.
4. Rossi G, Sherwin RS, Penzias AS, Lapaczewski P, Jacob RJ, Shulman GI, et al. Temporal changes in insulin resistance and secretion in 24-h-fasted conscious pregnant rats. *Am J Physiol* 1993,265:E845-851.
5. Bender HS, Chickering WR. Pregnancy and diabetes: the maternal response. *Life Sci* 1985,37:1-9.
6. Murphy VE, Smith R, Giles WB, Clifton VL. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr Rev* 2006,27:141-169.
7. Akerman F, Lei ZM, Rao CV. Human umbilical cord and fetal membranes coexpress leptin and its receptor genes. *Gynecological Endocrinol* 2002,16:299–306.

8. Lappas M, Yee K, Permezel M, Rice GE. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus complicated pregnancies. *J Endocrinol* 2005;186:457-465.
9. Hennen G, Franken F, Closset J, Gomez F, Pirens G, Khayat N. A human placental GH: increasing levels during second half of pregnancy with pituitary GH suppression as revealed by monoclonal antibody radioimmunoassay. *Int. J. Fertil* 1985;30:27-33.
10. Fant M, Munro H, Moses AC. An autocrine/paracrine role for insulin-like growth factors in the regulation of human placental growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:499-505.
11. Shibasaki T, Odagiri E, Shizume K, Ling N. Corticotropin-releasing factor-like activity in human placental extracts. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55:384-386.
12. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Confronting the tobacco epidemic in an era of trade liberalization. Geneva: WHO, 2003.
13. Dejmek J, Solansk I, Podrazilová K, Srám RJ. The exposure of nonsmoking and smoking mothers to environmental tobacco smoke during different gestational phases and fetal growth. *Environ Health Perspect* 2002;110:601-6.
14. Bergmann KE, Bergmann RL, Kries R, Böhm O, Richter R, Dudenhausen JW, et al. Early determinants of childhood overweight and adiposity in a birth cohort study: role of breast-feeding. *Int J Obesity and Relat Met Disord* 2003; 27:162-172.
15. Widemore M, Vik T, Jacobsen G, Bakketeig LS. Does maternal smoking during pregnancy cause childhood overweight? *Pediat and Perinat Epidemiol.* 2003;17:171-179.

16. Gao YJ, Holloway AC, Zeng ZH, Lim GE, Petrik JJ, Foster WG, et al. Prenatal exposure to nicotine causes postnatal obesity and altered perivascular adipose tissue function. *Obesity Research*. 2005;13:687–692.
17. Holloway AC, Lim GE, Petrik JJ, Foster WG, Morrison KM, Gerstein HC. Fetal and neonatal exposure to nicotine in Wistar rats results in increased beta cell apoptosis at birth and postnatal endocrine and metabolic changes associated with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005;48:2661–2666.
18. Magee BD, Hattis D, Kivel NM. Role of smoking in low birth weight. *J Reprod Med*. 2004;49(1): 23-7.
19. Chiolerio 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.
20. Cabello F, Hrepic G, Astudillo L, Benítez V, Ortega V, Poblete H, et al. Hábito de fumar y su relacion con el embarazo y la lactancia en Arica. *Rev Chil Pediatr* 1991;62:386-9.
21. Vio F, Salazar G, Infante C. Smoking during pregnancy and lactation and its effects on breast-milk volume. *Am J Clin Nutr* 1991;54:1011-6.
22. Leopércio W, Gigliotti A. Tabagismo e suas peculiaridades durante a gestação: uma revisão crítica. *J Bras Pneum* 2004;30(2):176-185.
23. Rimm EB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, et al. Cigarette smoking and the risk of diabetes in women. *Am J Public Health*. 1993;83:211-4.

24. Weis L, Schwanck GB, Silva JS, Lenzi LGS, Machado MB, Balotin R, et al. O papel da Proteína C Reativa (PCR) na detecção precoce de inflamação sistêmica em fumantes. *Rev AMRIGS* 2007;51(2):128-131.
25. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action. *N Engl J Med*. 1999;341:248-57.
26. Weitzman M, Cook S, Auinger P, Florin TA, Daniels S, Nguyen M, et al. Tobacco Smoke Exposure Is Associated With the Metabolic Syndrome in Adolescents. *Circulation* 2005;112:862-869.
27. Price TB, Krishnan-Sarin S, Rothman DL. Smoking impairs muscle recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E116–E122.
28. Chiolero A, Faeh D, Paccaud F, Cornuz J. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. *Am J Clin Nutr* 2008;87:801–809.
29. Eliasson B, Attvall S, Taskinen MR, Smith U. The insulin resistance syndrome in smokers is related to smoking habits *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1994;14:1946-1950.
30. Lyra R, Oliveira M, Lins D, Cavalcanti N. – Prevenção do diabetes mellitus tipo 2. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50(2):239-249
31. Ambrose JA, Barua RS. The Pathophysiology of Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease: An Update. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(10):1731–1737
32. Chan J, Rimm EB, Colditz G, Stampfer M, Willet W. Obesity, fat distribution and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 1994; 17:1-10.

33. Houston TK, Person SD, Pletcher MJ, Liu K, Iribarren C, Kiefe CI. Active and passive smoking and development of glucose intolerance among young adults in a prospective cohort: CARDIA study. *BMJ* 2006; 332:1064-1069.
34. Carnevalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002; 46(4): 419-425.
35. Zecchin HG, Carnevalheira JBC, Saad MJA. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2004;4:574-589.
36. Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Molecular Membrane Biology* 2001;18:247–256.
37. Joost & Thorens. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *AJP-Endocrinol Metab* 2002;282: E974–E976.
38. Machado UF, Schaan BD, Seraphim PM. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50(2):177-189.
39. Cedon Filha SP. Efeitos do fumo passivo no aparelho mucociliar de ratos. 1994. 101f. Tese (Doutorado em Medicina – Pneumologia) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
40. 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):289-293.

41. Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Ishihara A. Response of exposure to cigarette smoke at three dosage levels on soleus muscle fibers in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol* 2002;90(2):157-163.
42. Seraphim PM. A resistência à insulina reduz a expressão do gene do GLUT4 na presença e na ausência da obesidade. 2004. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
43. Lowry OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951;193:265-275.
44. Garfin DE. One-Dimensional Gel Eletrophoresis. *Methods Enzymol.*, 1990;182: 425-41.
45. Timmons TM & DUNBAR B. Protein Blotting an Immunodetection. *Methods Enzymol* 1990;182:679-88.
46. Krueger NJ & Hammondo JBW. Immunodetection of proteins on “Western” blots using 125I labeled protein A. *Methods Mol. Biol* 1988;3:409-17.
47. Klein LC, Corwin EJ, Ceballos RM. Leptin, hunger, and body weight: Influence of gender, tobacco smoking, and smoking abstinence. *Addict Behav* 2004;29(5):921-7.
48. Filozof C, Fernandez Pinilla MC, Fernandez-Cruz A. Smoking cessation and weight gain. *Obes Rev* 2004;5(2):95-103.
49. Ferrara CM, Kumar M, Nicklas B, McCrone S, Goldberg AP. Weight gain and adipose tissue metabolism after smoking cessation in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25(9):1322-6.

50. Sinzato KY, Lima PHO, Santos CEM, Campos KE, Rudge MVC, Damasceno DC. Association of diabetes and cigarette smoke exposure on the glycemia and liver glycogen of pregnant Wistar rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2008;23(6):481-5.
51. Stuebe AM, Rich-Edwards JW. The Reset Hypothesis: Lactation and Maternal Metabolism. *Am J Perinatol* 2009;26(1):81-8.
52. Hamosh M, Clary TR, Chernick SS, Scow RO. Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochim Biophys Acta* 1970;210:473–482.
53. Jamerson KA, Julius S, Gudbrandsson T, Andersson O, Brant DO. Reflex sympathetic activation induces acute insulin resistance in the human forearm. *Hypertension* 1993;21:618-623.
54. Garvey WT, Maianu L, Hancock JA, Golichowski AM, Baron A: Gene expression of GLUT4 in skeletal muscle from insulin-resistant patients with obesity, I G T, GDM, and NIDDM. *Diabetes* 41:465–475, 1992.
55. Boden G, Chen X, DeSantis RA, Kendrick Z. Effects of age and body fat on insulin resistance in healthy men. *Diabetes Care* 1993;16:728– 733.
56. Royer C, Lachuer J, Crouzoulon G, Roux J, Peyronnet J, Mamet J, Pequignot J, Dalmaz Y. Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of Glut3 and Glut4 transporters, hypoxia inducible factor-1 and thyroid hormone receptors in developing rat brain. *Brain Research* 856 (2000) 119–128.
57. Regazzetti C, Peraldi P, Grémeaux T, Lendom RN, Sahra IB, Cormont M, et al. Hypoxia Decreases Insulin Signaling Pathways in Adipocytes. *DIABETES* 2009; 58: 95-103.

58. Simpson WJ. A preliminary report on cigarette smoking and the incidence of prematurity. *Am J Obstet Gynecol* 1957;73:807–815.
59. Nelson E, Jodscheit K, Guo Y. Maternal passive smoking during pregnancy and fetal developmental toxicity. Part 1: gross morphological effects. *Hum Exp Toxicol*. 1999;18:252-6.
60. Ng SP, Conklin DJ, Bhatnagar A, Bolanowski DD, Lyon J, Zelikoff JT. Prenatal Exposure to Cigarette Smoke Induces Diet- and Sex-Dependent Dyslipidemia and Weight Gain in Adult Murine Offspring. *Environmental Health Perspectives*. 2009;117:1042-48.
61. Collet M, Beillard C. Consequences of smoking on fetal development and risk of intra-uterine growth retardation or in utero fetal death. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 2005;34:3S135-45.
62. 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*. 2005;75:S27-35.
63. Kayemba-Kay's S, Geary MP, Pringle J, Rodeck CH, Kingdom JC, Hindmarsh PC. Gender, smoking during pregnancy and gestational age influence cord leptin concentrations in newborn infants. *Europ J Endocrinol*. 2008;159:217–224.
64. Pardo IM, Geloneze B, Tambascia MA, Barros-Filho AA. Does maternal smoking influence leptin levels in term, appropriate for gestational age newborns? *J Matern Fetal and Neonat Med*. 2004;15:408–410.
65. Helland IB, Reseland JE, Saugstad OD, Drevon CA. Smoking related to plasma leptin concentration in pregnant women and their newborn infants. *Acta Paediatrica*. 2001;90:282–287.

66. Bruin JE, Kellenberger LD, Gerstein HC, Morrison KM, Holloway AC. Fetal and neonatal nicotine exposure and postnatal glucose homeostasis: identifying critical windows of exposure. *J Endocrinol.* 2007;194:171–178.
67. Shah NR, Bracken MB. A systematic review and metanalysis of prospective studies on the association between maternal cigarette smoking and preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182:465-72.
68. Mascola MA, Vunakis HV, Tager IB, Speizer FE, Hanrahan JP. Exposure of young infants to environmental tobacco smoke: breast-feeding among smoking mothers. *Am J Public Health.* 1998;88:893-6.
69. Mulhauser I. Smoking and diabetes. *Diabetic Med.* 1990;7:10-15.
70. De Grauw TJ, Myers RE, Scott WJ. Fetal growth retardation in rats from different levels of hypoxia. *Biol Neonate* 1986;49:85–89.
71. Ryder JW, Yang J, Galuska D, Rincón J, Björnholm M, Krook A, et al. Use of a novel impermeable biotinylated photolabeling reagent to assess insulin- and hypoxia-stimulated cell surface GLUT4 content in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2000;49:647–654.
72. Alves-Wagner ABT, Freitas HS, Souza PB, Seraphim PM, Mori RCT, Machado UF. β -adrenergic activity preserves GLUT4 protein in glycolytic fibers in fasting. *Muscle & Nerve* 2009;40: 847–854.
73. Seraphim PM, Nunes MT, Giannocco G, Machado UF. Age related obesity-induced shortening of GLUT4 mRNA poly(A) tail length in rat gastrocnemius skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;30;276(1-2):80-7.

74. Lima GA, Anhê GF, Giannocco G, Nunes MT, Correa-Giannella ML, Machado UF. Contractile activity per se induces transcriptional activation of SLC2A4 gene in soleus muscle: involvement of MEF2D, HIF-1a, and TRalpha transcriptional factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296:132-138.
75. Marin GH, Delgado L, Sager G, Visentín S, Azzaro S, Tozzi M. Consequences of smoking during pregnancy for mother and child. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant* 2003;2:159-164.
76. Barros RP, Morani A, Moriscot A, Machado UF. Insulin resistance of pregnancy involves estrogen-induced repression of muscle GLUT4. *Molecular and Cellular Endocrinology* 295 (2008) 24–31.
77. Louey S, Thornburg KL. The prenatal environment and later cardiovascular disease. *Early Hum Dev* 2005;81:745–751.

Manuscrito em avaliação desde setembro de 2010, submetido à:



**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO DURANTE A GESTAÇÃO
E A LACTAÇÃO DE RATAS E SUA PROLE SOBRE PARÂMETROS SÉRICOS E
MORFOMÉTRICOS**

Patrícia Rodrigues Lourenço Gomes¹, Patricia Monteiro Seraphim² – Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus Presidente Prudente, Departamento de Fisioterapia – Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia.

¹Mestrado em Fisioterapia, FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente, São Paulo.

²Profa. Dra. do Departamento de Fisioterapia da FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente, São Paulo.

Correspondência:

Patricia Monteiro Seraphim, Departamento de Fisioterapia, Faculdade de ciências e Tecnologia, UNESP, Campus de Presidente Prudente, Rua Roberto Simonsen, 305, CEP: 19060-900, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

E-mail: patricia@fct.unesp.br - Telefone: (18) 3229-5365 ramal 204

RESUMO

Objetivo: investigar o efeito do tabagismo em ratas durante os períodos de gestação e lactação em ratas sobre o ganho de peso corpóreo e tecidual, parâmetros séricos e produção láctea, e a repercussão na prole do nascimento até o período jovem adulto.

Métodos: Quarenta ratas Wistar, prenhes, foram divididas aleatoriamente em 4 grupos: CG – ratas não expostas à fumaça de cigarro e sacrificadas ao término da gestação; CL – ratas não expostas à fumaça de cigarro e sacrificadas ao término da lactação; FG – ratas expostas à fumaça de cigarro e sacrificadas ao término da gestação; FL - ratas expostas à fumaça de cigarro e sacrificadas ao término da lactação. As proles foram separadas por sexo e divididas conforme o grupo de suas mães. Nas mães foi analisada a produção láctea por filhote, o peso corpóreo na pré gestação, na gestação e na lactação. Nas proles foi analisado o peso corpóreo ao nascer, no primeiro e no segundo mês de vida. Foi coletado sangue para análise sérica por colorimetria e extraídos tecido adiposo branco, músculo esquelético gastrocnêmio, fígado e coração para pesagem e comparação. **Resultados:** o peso corpóreo estava diminuído no grupo FL durante a lactação. Nas mães lactantes CL e FL o tecido adiposo estava ausente e no grupo FG estava diminuído quando comparado ao grupo CG. As mães fumantes apresentaram maiores valores de glicemia, as mães lactantes apresentaram menor valor de HDL-colesterol sem alteração no colesterol total. Por fim, a produção láctea esteve diminuída em mães fumantes quando comparada as mães não fumantes. Nas proles das mães fumantes pode-se observar diminuição do peso corpóreo desde o nascimento até a fase jovem adulto, porém não houve alteração nos pesos teciduais dos grupos de ambos os sexos, embora tenham sido inferiores em todas as fêmeas comparadas aos machos, e o tecido adiposo não tenha sido detectado nas fêmeas. Houve aumento na glicemia da prole macho, sem alteração nos demais parâmetros. **Conclusões:** o fumo durante a gestação e lactação trouxe prejuízos tanto para a mãe como para o desenvolvimento da prole, alterando peso corpóreo, redistribuindo gordura corporal, prejudicando principalmente a homeostasia glicídica, bem como diminuindo a produção láctea da mãe por filhote, indicando que fumar durante a gravidez e lactação é responsável por alterações biológicas nas mães e, principalmente, na prole, as quais podem persistir até fase adulta.

Manuscrito em preparação a ser enviado para:



**MODULATION OF GLUCOSE TRANSPORTER PROTEIN GLUT4 AND
GLUCOSE HOMEOSTASIS OF RATS EXPOSED TO CIGARETTE SMOKE
DURING PREGNANCY AND LACTATION**

*MODULATION OF GLUT4 AND GLUCOSE DE FEMALE RATS EXPOSED TO
CIGARETTE SMOKE*

Patrícia Rodrigues Lourenço Gomes¹, Leidiane Maria dos Santos¹, Ubiratan Fabres
Machado², Patricia Monteiro Seraphim¹

¹ – State University of Sao Paulo - College of Science and Technology - UNESP, Sao Paulo - Brazil

² - University of Sao Paulo - Institute of Biomedical Sciences - USP, Sao Paulo - Brazil

Patricia Monteiro Seraphim

Departamento de Fisioterapia, Faculdade de ciências e Tecnologia, UNESP, Campus de Presidente Prudente

Rua Roberto Simonsen, 305, CEP: 19060-900

Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

E-mail: patricia@fct.unesp.br

ABSTRACT

Purpose: the purpose of this study was to evaluate the effect of smoking on glucose homeostasis and protein expression involved in glucose transport in skeletal muscle - GLUT4 in pregnant rats, investigating the involvement of two mechanisms: inflammation, through the suppressor of cytokine signaling - SOCS3 and hypoxia caused by exposure to cigarette smoke through the hypoxia-inducible factor 1 α - HIF1 α . **Methods:** Were used 40 female Wistar rats randomly divided into four groups: CG – control, not exposed to cigarette smoke, sacrificed to the end of pregnancy, CL – control, not exposed to cigarette smoke, sacrificed at the end of lactation, FG – smoking, exposure to cigarette smoke, sacrificed at the end of pregnancy, FL – smoking, exposure to cigarette smoke, sacrificed at the end of lactation. Blood was collected to serum analysis of glycemia and gastrocnemius skeletal muscle was removed for analysis of GLUT4, HIF-1 α and SOCS3 mRNA and protein content of GLUT4. **Results:** groups exposed to cigarette smoke had blood glucose values statistically higher than controls, being characterized as hyperglycemic and obtained protein content 48,38% and 39,94% lower than controls, respectively, there were no statistical changes in gene expression of the transporter. SOCS3 gene expression shows no significant difference and, the expression of HIF1 α there was an increase in the values of the groups of rats exposed to cigarette smoke, in FG HIF1 α gene was 13,93% higher compared to its control (CG) and FL gene was 32,72% higher expression in relation to CL. When analyzed the correlation between GLUT4 and HIF-1 α and SOCS3 mRNA, respectively, FL group showed a positive correlation between glucose transporter genes and hypoxia-induced factor 1 α , there was no correlation between the GLUT4 and SOCS3 gene. **Conclusions:** this study demonstrates that the association among pregnancy, lactation and exposure to cigarette smoke causes impairment in glucose homeostasis in rats and decreases GLUT4 protein content without change the gene expression of the transporter, but there is a positive correlation between the GLUT4 gene and HIF1 α .