

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO ANIMAL DE  
EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO TABACO DURANTE A  
GESTAÇÃO, INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA  
PROGRAMAÇÃO FETAL E SUAS REPERCUSSÕES  
METABÓLICAS NA VIDA ADULTA.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIANA DIHL SCHIFFNER

Porto Alegre, Brasil

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO ANIMAL DE  
EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO TABACO DURANTE A  
GESTAÇÃO, INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA  
PROGRAMAÇÃO FETAL E SUAS REPERCUSSÕES  
METABÓLICAS NA VIDA ADULTA.**

MARIANA DIHL SCHIFFNER

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Fernanda Urruth Fontella**

Porto Alegre, Brasil

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Schiffner, Mariana Dihl

ESTABELECIMENTO DE UM MODELO ANIMAL DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO TABACO DURANTE A GESTAÇÃO, INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA PROGRAMAÇÃO FETAL E SUAS REPERCUSSÕES METABÓLICAS NA VIDA ADULTA. / Mariana Dihl Schiffner.

-- 2012.

101 f.

Orientadora: Fernanda Urruth Pontella.

Coorientador: Marcelo Zubaran Goldani.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Poluição por Fumaça do Tabaco. 2. Cotinina. 3. Metabolismo. I. Pontella, Fernanda Urruth, orient. II. Goldani, Marcelo Zubaran, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE

**ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:**

17/08/2012

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ingrid Schweigert Perry  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr Mário Roberto Silveira Issler  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr Clécio Homrich da Silva  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

## **DEDICATÓRIA**

À minha amada família

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me fortalecer nos momentos mais difíceis e por encher a minha vida com sua graça e seus dons.

Aos professores Marcelo Goldani e Patrícia Pelufo Silveira, por suas contribuições e, em especial, à minha orientadora Dr<sup>a</sup> Fernanda Urruth Fontella pela paciência, apoio, carinho e incentivo em todos os momentos.

À equipe do Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente e à equipe da Unidade de Experimentação Animal do HCPA pela colaboração nessa pesquisa.

À amiga e companheira Ilaine Schuch pelo coleguismo, incentivo e carinho. Aos colegas de trabalho da UFRGS e da UBS Santa Cecília.

À Vânia Hirkata pela contribuição na análise estatística e à Roberta Friedrich por sua alegria e pelo auxílio com as referências.

Aos amigos que acompanharam tanto de perto como de longe minha caminhada, sempre me incentivando e entendendo minhas ausências.

À minha família sempre acreditando nas minhas escolhas, dando suporte nos momentos mais difíceis e vibrando com as minhas conquistas. Em especial à minha mãe e meus avós Celso e Lucy pela minha formação e pelo exemplo, sem eles eu não teria chegado até aqui. À minha irmã gêmea, Márcia, que é a minha metade nesse mundo. Por todos os nossos momentos divididos, pela cumplicidade e amor. Aos meus amados sobrinhos e afilhados Frederico e Maria Clara por serem meus tesouros.

Aos meus sogros, que considero como segundo pais, pelo apoio e amor a mim dedicados. Finalmente, ao meu marido, Francisco pela compreensão, escuta, paciência, enfim por me amar tanto assim. Juntos, multiplicamos sonhos e conquistas.

## RESUMO

**Introdução:** Muitos estudos relacionam o tabagismo materno durante a gestação com o aumento do risco de desfechos adversos para o feto, como o baixo peso ao nascer e restrição de crescimento intrauterino. Os objetivos deste trabalho foram: estabelecer um modelo animal de exposição ao tabaco durante a prenhez, usando como marcador de exposição a cotinina e a carboxihemoglobina; investigar os efeitos da exposição pré-natal ao tabaco sobre a biometria fetal e parâmetros bioquímicos; e investigar a programação fetal e suas repercussões na vida adulta. **Métodos:** Ratas Wistar foram randomicamente divididas em 3 grupos de exposição ao tabaco durante a gestação: controle (C), controle manipulado (CM) e tabaco (T). No grupo T as ratas foram expostas a fumaça de um cigarro 2x/dia, durante 21 dias. O grupo CM passou pela mesma intervenção do grupo T, porém sem sofrer exposição à fumaça do cigarro. O grupo C permaneceu na caixa-moradia sem qualquer tipo de interferência. O protocolo do presente estudo foi dividido em 2 experimentos. Experimento 1: no 22º dia de gestação um grupo de ratas genitoras foi submetida à cirurgia cesariana para a retirada dos filhotes. O sangue do tronco das genitoras foi coletado e o peso da placenta, bem como o comprimento e o peso dos filhotes foram medidos. Experimento 2: no 22º dia de gestação, um outro grupo de genitoras tiveram seus filhotes nascidos de parto normal e as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes. O peso dos filhotes foi aferido semanalmente até a vida adulta, quando foram realizados o teste de tolerância à glicose, o teste de corticosterona em resposta ao estresse e a medida da gordura abdominal. Para a medida da carboxihemoglobina (COHb) nas genitoras o sangue foi coletado imediatamente após a exposição a fumaça do cigarro. **Resultados:** O grupo exposto ao tabaco de forma aguda apresentou níveis mais elevados de COHb que o grupo CM. A exposição repetida ao tabaco aumentou substancialmente os níveis de cotinina, enquanto os grupos CM e C apresentaram níveis de cotinina abaixo do limite de detecção do método. Foi observado que os filhotes

expostos ao tabaco no período intrauterino nasceram com menor peso e menores níveis de insulina e glicemia. Em relação ao experimento 2, o acompanhamento do ganho de peso até a vida adulta não diferiu entre os grupos, somente entre os sexos, assim como a adiposidade. O teste de tolerância à glicose na vida adulta mostrou que o grupo exposto ao tabaco durante o período intrauterino apresentou resistência à ação da insulina. Conclusão: O modelo animal utilizado para expor ao tabaco durante a prenhez foi capaz de induzir a restrição do crescimento intrauterino (RCIU) e de programar o metabolismo na vida adulta. Este modelo animal mostra-se útil na investigação de outros desfechos e mecanismos relacionados à exposição tabágica durante a gestação.

Palavras-chave: Poluição por Fumaça de Tabaco, Cotinina, Metabolismo.



## ABSTRACT

**Introduction:** Many studies have linked maternal smoking during pregnancy with increased risk of adverse outcomes. The objective of this study was to establish an animal model of tobacco exposure during pregnancy, using as a marker of exposure to cotinine and carboxyhemoglobin. Also, investigate the effects of prenatal exposure to tobacco smoke on fetal biometry and biochemical parameters. It also aimed to investigate the fetal programming and its repercussions in adulthood. **Methodology:** Repeated exposure to tobacco smoke during pregnancy: The animals were randomly assigned to three groups: control (C), manipulated control (MC) and tobacco (T). The animals were exposed to a one cigarette twice a day for 21 days. The manipulated control group went through the same intervention group T, without suffering smoke exposure. The group C remained intact in the home cage. **Experiment 1:** on 22<sup>nd</sup> day of pregnancy was performed a cesarean section. The trunk blood was collected of the pregnant rats and fetal biometry measured. **Experiment 2:** on the 22<sup>nd</sup> day of pregnancy the pups were born by natural delivery and the litters were standardized to eight pups per litter. The weight of offspring was measured weekly until adulthood. At this stage we evaluated the glucose tolerance test and, at the time of sacrifice, the adiposity. Immediately after the intervention, the trunk blood was collected for carboxyhemoglobin (COHb) measurement. **Results:** the animals exposed to tobacco acutely showed higher levels of COHb than the MC group. Repeated exposure to tobacco increased substantially cotinine levels, whereas in MC and C groups cotinine levels were below the limit of detection. It was observed that pups exposed to tobacco intrauterine period were born with lower weight and lower levels of insulin and glucose. Regarding the second experiment, monitoring of weight gain until adulthood did not differ between groups, only gender, and adiposity. The glucose tolerance test in adult life showed that the group exposed to tobacco during the intrauterine period showed resistance to insulin action. **Conclusion:**

The animal model used to expose the tobacco during pregnancy was able to induce intrauterine growth restriction and programming metabolism in later life. This animal model shown to be useful for studies on other outcomes, and mechanisms related to tobacco smoke exposure during pregnancy.

**Key words:** Tobacco Smoke Pollution, Cotinine, Metabolism

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Adaptação fetal à desnutrição.	24
Figura 2: Sistema utilizado para exposição dos animais ao tabaco.	33
Figura 3: Diagrama do método para dosagem de COHb	34
Figura 4: Diagrama do método de exposição repetida ao tabaco durante a gestação	36
Figura 5: Diagrama do método geral da etapa 2.	38
Figura 6: Linha do tempo dos testes realizados na etapa 2.	39
Figura 7: Níveis de carboxihemoglobina entre os grupos tabaco e controle manipulado após intervenção.	43
Figura 8: Ganho de peso durante as 3 semanas de prenhez entre os grupos Controle, Controle Manipulado e Tabaco.	44
Figura 9: Peso médio ao nascer dos filhotes dos grupos C, CM e T.	47
Figura 10: Glicemia (mg/dL) dos filhotes entre os grupos C, CM e T.	49
Figura 11: Insulinemia ( $\mu$ U/mL) dos filhotes entre os grupos C, CM e T.	50
Figura 12A: Ganho de peso corporal durante o 7º dia de vida pós-natal ao 21º dia de vida pós-natal nos machos controle, machos controle manipulado, machos tabaco e entre as fêmeas controle, fêmeas controle manipulado e fêmeas tabaco.	51
Figura 12B: Ganho de peso corporal ao longo de 8 semanas de vida após o desmame, nos machos controle, machos controle manipulado, machos tabaco e entre as fêmeas controle, fêmeas controle manipulado e fêmeas tabaco.	52
Figura 13: Teste de tolerância a glicose entre os grupos controle, controle manipulado e tabaco.	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Consumo de ração padrão ao longo das 3 semanas de prenhez	45
Tabela 2: Concentração de cotinina no soro de acordo com o grupo	45
Tabela 3: Glicemia materna de acordo com grupo	46
Tabela 4: Análise das variáveis relacionadas à biometria fetal: comprimento ao nascer, peso da placenta e percentual da placenta em relação ao peso do filhote	48
Tabela 5: Peso médio da ninhada ao nascer	50
Tabela 6: Adiposidade abdominal conforme grupo e sexo	53
Tabela 7: Área sob a curva de corticosterona (ng/mL) conforme grupo e sexo.	53
Tabela 8: Teste de tolerância à glicose no basal e no pico glicêmico	54
Tabela 9: Parâmetros bioquímicos na vida adulta, segundo grupo e sexo	56

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ACTH – Hormônio adrenocorticotrópico

ANOVA - Análise de Variância

CO – Monóxido de carbono

COHb – Carboxihemoglobina

CRH - Hormônio liberador de corticotrofina

CT – Colesterol total

DPM - Desvio padrão da média

DOHaD - *Developmental origins of health and disease*. Origens Desenvolvimentistas da saúde e da doença.

DM 2 - Diabetes *mellitus* tipo 2

GEE - *Generalized Estimating Equations*

GLUT 1 – Transportador de glicose tipo 1

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HHA - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

HPLC - *High-Performance Liquid Chromatography*

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

n – Tamanho da amostra

RCIU - Restrição de Crescimento Intrauterino

RPM - Rotação por minuto

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

TG - Triglicerídeos

TTG - Teste de tolerância a glicose

UEA - Unidade de Experimentação Animal

WHO - *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1 MODELOS DE EXPOSIÇÃO .....	20
2.2 A CONSTITUIÇÃO DA FUMAÇA DO TABACO.....	21
2.3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO TABACO .....	22
2.4 <i>DEVELOPMENTAL ORIGINS OF HEALTH AND DISEASE</i> (DOHaD - Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença).....	23
2.5 O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HHA).....	25
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>28</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
4.2.1 Etapa 1:.....	29
4.2.2 Etapa 2:.....	30
<b>5 HIPÓTESE</b> .....	<b>31</b>
<b>6 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
6.1 MÉTODO GERAL.....	32
6.1.1 Animais experimentais.....	32
6.1.2 Procedimentos de exposição repetida ao tabaco.....	32
6.2 ETAPA 1 .....	33
6.2.1 Exposição aguda ao tabaco .....	34
6.2.2 Exposição repetida ao tabaco durante a gestação .....	35
6.3 ETAPA 2 .....	37
6.3.1 Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento .....	39
6.3.2 Curva do teste de tolerância a glicose.....	40
6.3.3 Coleta de material biológico .....	40
6.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	41
<b>7 RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
7.1 RESULTADOS DA ETAPA 1 .....	43
7.1.1 Exposição aguda .....	43

7.1.1.1 Carboxihemoglobina .....	43
<b>7.1.2 Exposição repetida.....</b>	<b>43</b>
7.1.2.1 Ganho de peso das genitoras durante a prenhez .....	43
7.1.2.2 Consumo de ração padrão durante a prenhez .....	44
7.1.2.3 Cotinina .....	45
7.1.2.4 Glicemia das genitoras.....	46
7.1.2.5 Peso ao nascer.....	46
7.1.2.6 Comprimento ao nascer, peso da placenta e percentual da placenta em relação ao peso do filhote .....	47
7.1.2.7 Glicemia dos filhotes .....	48
7.1.2.8 Insulinemia dos filhotes.....	49
<b>7.2 RESULTADOS DA ETAPA 2 .....</b>	<b>50</b>
<b>7.2.1Peso ao nascer .....</b>	<b>50</b>
<b>7.2.2 Acompanhamento do ganho de peso.....</b>	<b>51</b>
<b>7.2.3 Quantificação da adiposidade abdominal .....</b>	<b>52</b>
<b>7.2.4 Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento: dados preliminares .....</b>	<b>53</b>
<b>7.2.5 Curva do teste de tolerância a glicose.....</b>	<b>54</b>
<b>7.2.6 Perfil bioquímico .....</b>	<b>55</b>
<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
8.1. ETAPA 1 .....	57
8.2. ETAPA 2 .....	62
<b>9 CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO A - ARTIGO: ESTABLISHING AN ANIMAL MODEL OF PASSIVE EXPOSURE TO TOBACCO SMOKE DURING PREGNANCY: METABOLIC OUTCOMES ON FETAL DEVELOPMENT .....</b>	<b>82</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O tabagismo é um dos fatores de risco modificáveis mais importantes para os desfechos adversos de saúde e uma das principais causas de morbidade e mortalidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

O hábito tabágico é amplamente disseminado ao redor do mundo. Sua utilização varia substancialmente entre nações, etnias e gêneros (UNGER *et al.*, 2003). Existem atualmente cerca de 1 bilhão de fumantes no mundo. A prevalência de tabagismo diário de cigarros na população acima de 15 anos para ambos os sexos é de 26 % na Alemanha, 26,9% na França, 27,2% na Espanha e de 15,8% nos Estados Unidos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Um estudo realizado no Camboja demonstrou que aproximadamente 30% das gestantes são expostas ao tabaco de maneira involuntária, ou passivamente, tanto em suas casas, como no trabalho ou em lugares públicos (RUDATSIKIRA *et al.*, 2008). Dados relativos ao Reino Unido apontaram uma exposição passiva ao tabaco de 13% (WARD *et al.*, 2007). Os fetos dessas gestantes também são considerados fumantes involuntários, sob o ponto de vista da exposição ao tabaco.

Segundo as estatísticas do Instituto Nacional do Câncer, no Brasil, um terço da população adulta é fumante e ocorrem aproximadamente 200 mil óbitos anuais relacionados ao fumo no país (ARAÚJO *et al.*, 2004). A exposição de pessoas fumantes e não fumantes à fumaça de produtos de tabaco é uma questão relevante para as políticas públicas de saúde (BRASIL, 2010).

No Brasil, em Rio Grande (RS), a prevalência do tabagismo materno na gestação foi de 23,3% e quase um terço das mulheres esteve exposta de forma passiva ao fumo durante a gestação (ZHANG *et al.*, 2011).

A fumaça do cigarro é composta por mais de quatro mil substâncias químicas entre elas, monóxido de carbono (CO), nicotina, tolueno, benzeno, metais pesados e outras substâncias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1986; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2006; CHAOUACHI, 2009; COMMITTEE ON SECONDHAND SMOKE EXPOSURE *et al.*, 2010). A fumaça do tabaco pode ser classificada em principal e secundária. A fumaça principal provém da fumaça exalada pelo fumante, enquanto que a secundária, também denominada de lateral, se origina da queima da ponta do cigarro. A exposição passiva ao tabaco se caracteriza por uma complexa mistura que é composta por ambas as fumaças e é inalada por indivíduos não fumantes que convivem com fumantes em ambientes fechados (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012).

Dentre os compostos químicos presentes na fumaça do tabaco, podem-se destacar a nicotina e o monóxido de carbono (CO) como os mais pesquisados. Em gestantes, a nicotina age, possivelmente, através do aumento da produção de catecolaminas maternas, responsáveis por vasoconstrição e diminuição da perfusão uterina, o que poderia explicar o aumento da frequência cardíaca fetal que ocorre após o uso do cigarro pela gestante (QUIGLEY *et al.*, 1979; MADI *et al.*, 1984; ALEIXO NETO, 1990; MELLO *et al.*, 2001). Além disso, a exposição perinatal à nicotina tem sido relacionada a alterações na cognição (CUTLER *et al.*, 1996) e no desenvolvimento psicomotor (SCHLUMPF *et al.*, 1988). Por outro lado, o CO é causador de hipóxia materna e fetal ao combinar-se com a hemoglobina tanto da mãe quanto do bebê (PINTO e BOTELHO, 2000; MELLO *et al.*, 2001; LEOPÉRCIO e GIGLIOTTI, 2004). A permanência desta hipóxia pode ser um fator

relevante no retardo do crescimento fetal (PINTO e BOTELHO, 2000; KUCZKOWSKI, 2004).

Muitos estudos relacionam o tabagismo materno durante a gestação com o aumento do risco de desfechos materno-fetais adversos, como baixo peso ao nascer, restrição de crescimento intrauterino (RCIU), aborto espontâneo, descolamento prematuro da placenta e placenta prévia (ALEIXO NETO, 1990; HATSUKAMI *et al.*, 2003; US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2004; BEST, 2009; ROGERS, 2009). Também há relatos de alterações no crescimento (BERNSTEIN *et al.*, 2000; PRINGLE *et al.*, 2005; VIELWERTH *et al.*, 2007), no sistema respiratório (BILLAUD e LEMARIE, 2001) e circulatório (BLAKE *et al.*, 2000) e no metabolismo (PRINGLE *et al.*, 2005; RODRIGUEZ-MORAN *et al.*, 2007). Entretanto, estudos envolvendo a exposição passiva ao tabaco de mulheres durante a gestação mostraram que essa forma de exposição também pode causar repercussões como baixo peso ao nascer e parto prematuro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; BARRADAS, 2011). A ocorrência de restrição crescimento intrauterino, aborto espontâneo e atraso no desenvolvimento pulmonar em razão da exposição passiva ao tabaco ainda são controversas (BARRADAS, 2011).

O estudo dos mecanismos bioquímicos e moleculares possivelmente envolvidos nesses desfechos ainda não foram totalmente elucidados. Dessa forma, a utilização de um modelo animal adequado permite essa abordagem através do maior controle sobre fatores confundidores, com a obtenção de material biológico e com custo relativamente baixo.

Em vista do exposto acima, esse projeto teve por objetivo validar um modelo animal de exposição passiva ao tabaco durante o período gestacional que possibilitará estudar os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos nos desfechos adversos dessa exposição.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 MODELOS DE EXPOSIÇÃO

Os modelos experimentais possibilitam investigar a causalidade das associações observadas e os mecanismos subjacentes. Além disso, a utilização do modelo animal permite o maior controle sobre fatores ambientais e genéticos, bem como possibilita o acompanhamento dos animais ao longo da vida em um curto período de tempo, sendo seu custo relativamente baixo. (MCMULLEN e MOSTYN, 2009). Ainda, o estabelecimento de um modelo animal permite a obtenção de material biológico em menor período de tempo.

Há vários modelos animais desenvolvidos para o estudo dos efeitos do tabaco. Dentre eles, pode-se destacar a administração oral de nicotina como substituta da fumaça do cigarro (SLOTKIN, 1998; WICKSTROM, 2007) e a exposição passiva à fumaça do cigarro (GONÇALVES-SILVA *et al.*, 1997; MELLO *et al.*, 2005; FARKAS *et al.*, 2006; CARMINES e RAJENDRAN, 2008; ESPOSITO *et al.*, 2008). O primeiro tem a vantagem de avaliar os efeitos de um metabólito específico e de fácil realização. No entanto, a nicotina absorvida oralmente sofre metabolismo de primeira passagem, além de ser uma forma de absorção diferente da que ocorre com o tabagismo e a exposição passiva ao tabaco (BENOWITZ, 1996). Outros modelos animais utilizam a nicotina em infusão contínua o que não simula os picos de nicotina observados em fumantes (SMITH e FISCHER, 2001; WICKSTROM, 2007). Ainda, a dose de nicotina utilizada nos modelos animais é muito mais alta que as doses encontradas em fumantes e muito maior que aquela observada em fumantes passivos (COMMITTEE ON SECONDHAND SMOKE EXPOSURE *et al.*, 2010). Por outro lado, a exposição passiva ao cigarro permite um estudo mais abrangente envolvendo todos os outros metabólitos do tabaco sabidamente nocivos à saúde. A

exposição à fumaça do tabaco simularia o fumo passivo em humanos, tornando-se o modelo mais próximo da realidade.

## **2.2 A CONSTITUIÇÃO DA FUMAÇA DO TABACO**

A fumaça principal do tabaco é produzida em altas temperaturas (em torno de 950°C) e polui o ambiente após ser puxada através do cigarro, filtrada pelos pulmões e em seguida exalada. Já a fumaça secundária é produzida a temperaturas mais baixas, 350°C, durante a queima lenta do cigarro (MELLO *et al.*, 2001). Cerca de 85% do fumo passivo é composta pela fumaça secundária, sendo o restante constituído da fumaça principal. Ambas formam a poluição tabágica ambiental. Embora a composição da fumaça principal e secundária sejam qualitativamente similares, há uma substancial diferença quantitativa na sua composição (COMMITTEE ON SECONDHAND SMOKE EXPOSURE *et al.*, 2010). Pesquisas em animais revelam que a exposição à fumaça secundária resulta em concentrações mais elevadas de carboxihemoglobina, nicotina e cotinina que a exposição à igual quantidade da corrente principal (SCHICK e GLANTZ, 2005).

A poluição tabágica ambiental é uma mistura dinâmica que muda de características e concentração com o tempo e a distância percorrida desde que foi formada. Sua concentração depende da intensidade do tabagismo, ou seja, do número de pessoas fumantes, e da quantidade de tabaco que cada um fuma no local, da diluição por ventilação e de outros processos que removem a fumaça do ar (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2006).

A fumaça do cigarro é um complexo aerossol formada por duas fases: a gasosa e a particulada. A fase gasosa é constituída por ar, CO, dióxido de carbono e muitos outros produtos químicos, incluindo acetaldeído, formaldeído, hidrocarbonetos (tal como benzeno,

tolueno, e alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos). A fase particulada consiste em mais milhares de produtos químicos, incluindo alcatrão, nicotina, alcalóides, níquel, cádmio, arsênio e chumbo (COMMITTEE ON SECONDHAND SMOKE EXPOSURE *et al.*, 2010).

Todas essas substâncias contribuem individualmente para os efeitos nocivos da exposição ao tabaco. No entanto, muito provavelmente, sua toxicidade não possa ser atribuída a uma substância isoladamente, mas sim ao efeito sinérgico que ocorre entre as substâncias presentes na sua composição.

### **2.3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO TABACO**

Há vários parâmetros biológicos que podem ser alterados quando interagem com um agente químico. No entanto, a determinação quantitativa destes parâmetros usados como indicadores biológicos ou biomarcadores só é possível se existir correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico da substância (AMORIM, 2003). Segundo o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2006), um biomarcador de exposição é definido como uma substância exógena ou o seu metabólito, ou o produto da interação entre um agente xenobiótico e algumas moléculas ou células alvo, que é medido em um compartimento do organismo.

Os biomarcadores mais comumente usados para avaliar exposição passiva ao tabaco são: o CO, a carboxihemoglobina (COHb), o tiocinato e a nicotina e seus metabólitos (SCHERER e RICHTER, 1997). Absorção de CO certamente reflete a exposição aguda à exposição tabágica ambiental (CHAOUACHI, 2009). No entanto, o monóxido de carbono é inespecífico, ou seja, existem outras fontes significativas desse elemento além da exposição

tabágica ambiental, incluindo o próprio metabolismo, além de ser pouco sensível (BENOWITZ, 1996; 1999).

A nicotina inalada através dos pulmões chega à corrente sanguínea e circula por vários órgãos, como o fígado e os rins. O fígado converte a nicotina em vários metabólitos, sendo cerca de 70 a 80% convertida em cotinina. A meia-vida da nicotina é em média de 2 a 3h. Com a exposição intermitente, os níveis de nicotina oscilam ao longo do dia. Por apresentar maior meia-vida (17h), os níveis de cotinina tendem a se acumular ao longo do dia. A exposição intermitente à nicotina, como ocorre com o tabagismo, mantém os níveis de cotinina relativamente constantes ao longo do dia. A cotinina também pode ser dosada em outros fluídos biológicos, como na urina e na saliva, mas a dose absorvida de nicotina é melhor indicada pela concentração de cotinina no sangue (BENOWITZ, 1996).

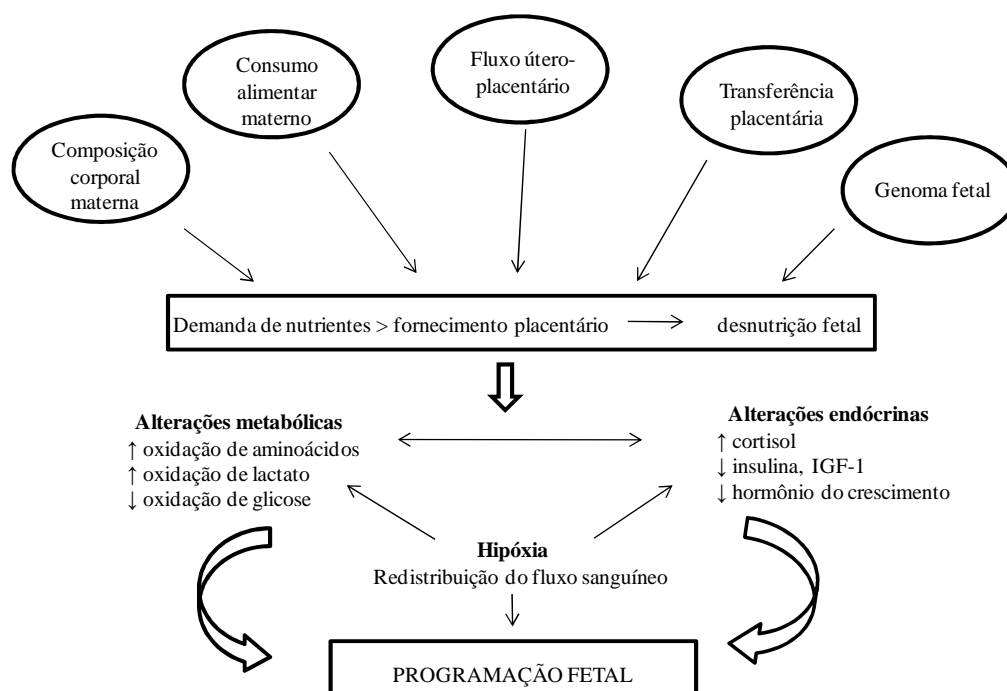
Atualmente, a cotinina tem sido utilizada como o biomarcador mais sensível e específico da exposição passiva ao tabaco (BENOWITZ, 1996; HATSUKAMI *et al.*, 2003; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2006; CHAOUACHI, 2009).

#### **2.4 DEVELOPMENTAL ORIGINS OF HEALTH AND DISEASE (DOHaD - Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença)**

Estudos epidemiológicos em diversas partes do mundo relacionam a influência de determinados fatores ambientais no início da vida com alterações na expressão da carga genética do indivíduo, modificando o padrão de saúde-doença (SILVEIRA *et al.*, 2007). Barker e colaboradores desenvolveram a hipótese da origem fetal da doença do adulto, na qual condições adversas intrauterinas podem programar o risco de doenças cardiovasculares e doenças crônicas na vida adulta ( BARKER *et al.*, 1989; BARKER, 1998) . Segundo essa hipótese, o feto adapta-se à desnutrição através de alterações metabólicas, redistribuição do

fluxo sanguíneo, mudanças na produção de hormônios fetais e placentários com influência sobre o crescimento, como ilustra a figura 1 (BARKER, 1998). Os efeitos a longo prazo do déficit nutricional durante a vida precoce dependem da causa, do tempo e da intensidade de privação, tais fatores determinam os tecidos específicos cujo desenvolvimento é prejudicado (HALES e BARKER, 1992).

Muitos estudos suportam a hipótese de que a desnutrição fetal programa o indivíduo para doença cardiovascular, hipertensão e *diabetes mellitus* tipo 2 (DM 2) na vida adulta (BARKER *et al.*, 1989; HALES e BARKER, 1992; MOORE *et al.*, 1996; LEON *et al.*, 2000). Além destes desfechos, a obesidade e a dislipidemia também foram associadas com a desnutrição fetal, dessa forma, contribuindo para o desenvolvimento da síndrome metabólica na vida adulta (LAITINEN *et al.*, 2000; DAVIES *et al.*, 2004).



**Figura 1: Adaptação fetal à desnutrição.**

Fonte: Modificado de Barker (1998).



Nesse contexto, diferentes modelos animais foram propostos para estudar a RCIU e seus desfechos como, por exemplo, ligação da artéria uterina, restrição de proteína na dieta materna durante a prenhez e exposição à glicocorticóide na gestação (VUGUIN, 2007; LANGLEY-EVANS, 2009). Contudo, a disponibilidade de alimentos durante a gravidez não é um fator frequentemente limitante para o desenvolvimento fetal nas sociedades ocidentais. Já a insuficiência placentária, o estresse e a exposição voluntária ou passiva a poluentes químicos são mais representativos do ambiente fetal nessas sociedades (SOMM *et al.*, 2009).

Considerando que a gestação é um período crítico para o desenvolvimento fetal, a exposição ao tabaco nesta fase da vida torna o feto altamente vulnerável aos efeitos dos componentes da fumaça do cigarro, assim como, às alterações na oxigenação e no metabolismo placentário.

Dessa forma, a exposição ao tabaco durante o período intrauterino desencadeia alterações metabólicas e moleculares adaptativas capazes de programar o indivíduo a longo-prazo, causando efeitos observáveis na vida adulta.

## **2.5 O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HHA)**

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal juntamente com o sistema nervoso autônomo constituem as principais vias para a manutenção das funções vitais durante a resposta ao estresse (KYROU e TSIGOS, 2009). O eixo HHA recebe e integra diversos estímulos cognitivos, emocionais, neurosensoriais e periféricos somáticos que chegam por vias distintas (CHARMANDARI *et al.*, 2005). Esses estímulos promovem a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no sistema porta hipofisiário, que tem acesso à porção anterior da glândula pituitária. A ligação do CRH no seu receptor na pituitária induz

a secreção de ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) na circulação sistêmica. Por sua vez, o ACTH estimula o córtex adrenal a secretar glicocorticóides que são os mediadores finais do eixo HHA (CHARMANDARI *et al.*, 2005; KYROU e TSIGOS, 2009).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é passível de programação no período neonatal. A responsividade do eixo HHA em mamíferos flutua no período perinatal, sendo moderadamente responsiva no momento do nascimento, mas diminuindo em intensidade no período neonatal (ROKICKI *et al.*, 1990; BERGANT *et al.*, 1998).

O eixo HHA de fetos humanos está bem desenvolvido e funcional no final da gestação e é capaz de responder a fatores externos, especialmente à hipóxia e à restrição de nutrientes (PHILLIPS e JONES, 2006). Existem evidências de que o tabagismo crônico resulta em níveis elevados de cortisol no plasma e na saliva (TZIOMALOS e CHARSOULIS, 2004). No entanto, níveis normais de cortisol urinário em fumantes também têm sido relatados (TZIOMALOS e CHARSOULIS, 2004). McDonald *et al.* (2006), demonstraram pela primeira vez, que fetos expostos ao tabaco no período fetal apresentam níveis elevados de ACTH.

Em ratos há um pico de corticosterona no último estágio fetal seguido de pouca responsividade até o fim da segunda semana de vida, fato conhecido como período hiporresponsivo ao estresse (GUILLET e MICHAELSON, 1978; SAPOLSKY e MEANEY, 1986). Caracteristicamente, há uma exacerbação do mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticóides na hipófise e diminuição da sensibilidade da adrenal ao ACTH neste período (YOSHIMURA *et al.*, 2003).

Conforme propõe o conceito de programação, a submissão do rato a um estímulo ou estressor nesses primeiros dias determina alterações neuroquímicas e comportamentais observáveis durante toda a vida. Embora “hiporresponsivos”, esses animais respondem agudamente ao estresse (KUHN *et al.*, 1990), sendo que a resposta aumenta

progressivamente nas 24 horas subsequentes. Além disso, nessa fase, os níveis de transcortina são muito baixos, sendo que a maior parte da corticosterona circula em sua forma não-ligada e, portanto, biologicamente ativa (HENNING, 1978). Logo, mesmo que a concentração total da corticosterona plasmática seja baixa no período hiporresponsivo, a concentração de corticosterona biologicamente ativa é relativamente alta, o que é suficiente para que o hormônio exerça suas ações biológicas e possivelmente atue programando o sistema nervoso central de forma persistente.

Considerando que a exposição ao tabaco na gestação tem impacto sobre o crescimento fetal e que a RCIU está associada com alterações metabólicas e, ainda, que o eixo HHA parece mediar esses efeitos os animais expostos à fumaça do tabaco no período intrauterino poderiam apresentar um padrão de resposta ao estresse diferente dos animais não-expostos ao tabaco na vida fetal.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Eventos precoces ocorridos ainda no período intrauterino que afetam o crescimento e o desenvolvimento fetal podem influenciar o padrão de saúde e de doença na idade adulta. As consequências do tabagismo materno durante a gestação já são conhecidas, como baixo peso ao nascer, parto prematuro, maior risco de abortamento, entre outras. Ainda é controversa a associação entre fumo passivo durante a gestação e desfechos adversos para o conceito. Os mecanismos bioquímicos e moleculares possivelmente envolvidos nesses desfechos ainda não foram totalmente elucidados. O estabelecimento de um modelo animal adequado permite essas avaliações através da fácil obtenção de material biológico e em menor período de tempo, além de possibilitar o controle ambiental, evitando fatores confundidores.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Estabelecer um modelo animal de exposição ao tabaco durante a gestação, tendo como desfecho o baixo peso ao nascer, assim como o possível impacto metabólico desta exposição nos animais na vida adulta.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **4.2.1 Etapa 1:**

- Verificar a exposição aguda ao tabaco através dos níveis de carboxihemoglobina no sangue de ratas.
- Monitorar a exposição ao tabaco durante a prenhez através da medida dos níveis de cotinina no sangue materno.
- Verificar o ganho de peso materno durante a prenhez.
- Verificar a glicemia materna das ratas expostas ao tabaco durante a prenhez.
- Avaliar o efeito da exposição ao tabaco durante o período intrauterino sobre a glicemia, a insulinemia e o peso da placenta, peso e comprimento dos filhotes.

#### 4.2.2 Etapa 2:

- Avaliar o efeito da exposição ao tabaco no período intrauterino sobre o ganho de peso dos filhotes até a vida adulta.
- Avaliar a liberação de corticosterona em resposta a estresse de restrição em ratos adultos expostos na vida fetal ao tabaco por intermédio das suas genitoras.
- Avaliar o teste de tolerância à glicose em ratos adultos expostos na vida fetal ao tabaco por intermédio das suas genitoras.
- Avaliar o perfil lipídico e de glicemia de ratos adultos expostos ao tabaco no período intrauterino.

## **5 HIPÓTESE**

A exposição passiva ao tabaco durante a gestação é um possível insulto ao qual um feto pode ser exposto. Tal exposição altera o peso ao nascer e o metabolismo fetal, bem como modifica as respostas metabólicas e ao estresse na vida adulta.

## **6 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.1 MÉTODO GERAL**

#### **6.1.1 Animais experimentais**

Foram utilizadas ratas Wistar provenientes do biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) com peso entre 200 e 300g. Os animais foram ambientados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA por 7 dias e após foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos. As ratas permaneceram individualmente em caixas-moradia, confeccionadas em plexiglas medindo 41 x 34 x 16 cm, com assoalho recoberto de maravalha, mantidas em ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12 horas, temperatura média de 22°C ± 2°C, 70% de umidade e ração padrão e a água *ad libidum*. A limpeza das caixas era realizada uma vez por semana.

#### **6.1.2 Procedimentos de exposição repetida ao tabaco**

O sistema de exposição ao tabaco foi baseado no modelo de MELLO *et al.* (2005). Os aparatos de exposição ao tabaco foram confeccionados pela marcenaria do HCPA e consistiam em duas caixas de madeira revestida de fórmica, medindo 94 cm de comprimento x 39,5 cm de altura x 38,5cm de largura, divididas em dois compartimentos: um de combustão (CC) e outro de exposição (CE) (figura 2). No compartimento de combustão havia um suporte de metal onde os cigarros eram fixados na posição vertical para a queima passiva e no compartimento de exposição havia uma caixa-moradia com maravalha e tampa



de grade. Os compartimentos eram separados entre si por uma divisória fenestrada, com um sistema de exaustão da fumaça na parte superior do compartimento de exposição, no ponto mais distante da combustão. Essa disposição garantia que a fumaça gerada pelo cigarro fosse arrastada para o ambiente onde os animais se encontravam. Um cano de PVC conduzia o ar da caixa até o exterior do prédio. No momento da exposição ao tabaco os animais (3 ratas por vez) eram colocadas nesta caixa-moradia e um cigarro da marca Marlboro embalagem vermelha ® (Phillip Morris) era aceso e colocado no espaço central do suporte de metal. A queima durava cerca de 15 minutos. A exaustão era ligada durante 10 segundos a cada 5 minutos. Após a queima total, a exaustão permanecia ligada por mais 15 min para a completa remoção da fumaça. O grupo CM passou pela mesma intervenção, no entanto, sem ser exposto ao tabaco.



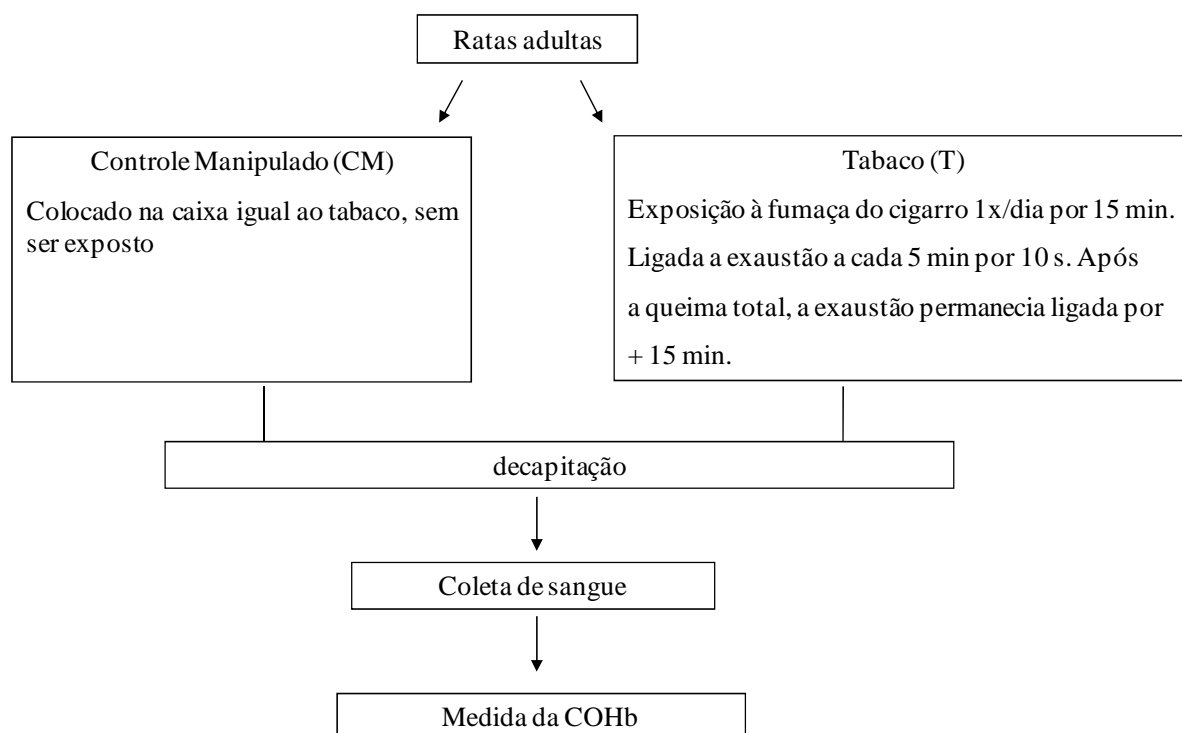
**Figura 2: Aparato utilizado para exposição dos animais ao tabaco.**

## 6.2 ETAPA 1

A etapa 1 consistiu de dois experimentos (exposição aguda e exposição repetida)

### 6.2.1 Exposição aguda ao tabaco

Para averiguar a exposição aguda ao tabaco utilizou-se um marcador de fase gasosa, a COHb sanguínea, molécula resultante da reação CO com a hemoglobina. Esta formação depende da duração da exposição ao CO, concentração desse gás no ar inspirado, da intensidade da tragada e do número de cigarros fumados (CARMINES e RAJENDRAN, 2008). Para realização desse experimento utilizou-se 12 ratas Wistar divididas em dois grupos: 6 tabaco (T) e 6 controle manipulado (CM). As ratas do grupo T foram expostas uma única vez ao cigarro conforme procedimento de exposição ao tabaco e, após, decapitadas. O sangue coletado do tronco foi imediatamente utilizado para análise de COHb por gasometria no Laboratório de Análises Clínicas do HCPA. As ratas do grupo CM passaram pelo mesmo procedimento em uma caixa idêntica à do tabaco, sem exposição ao cigarro, como mostra a figura 3.



**Figura 3: Diagrama do método para dosagem de COHb.**

### 6.2.2 Exposição repetida ao tabaco durante a gestação

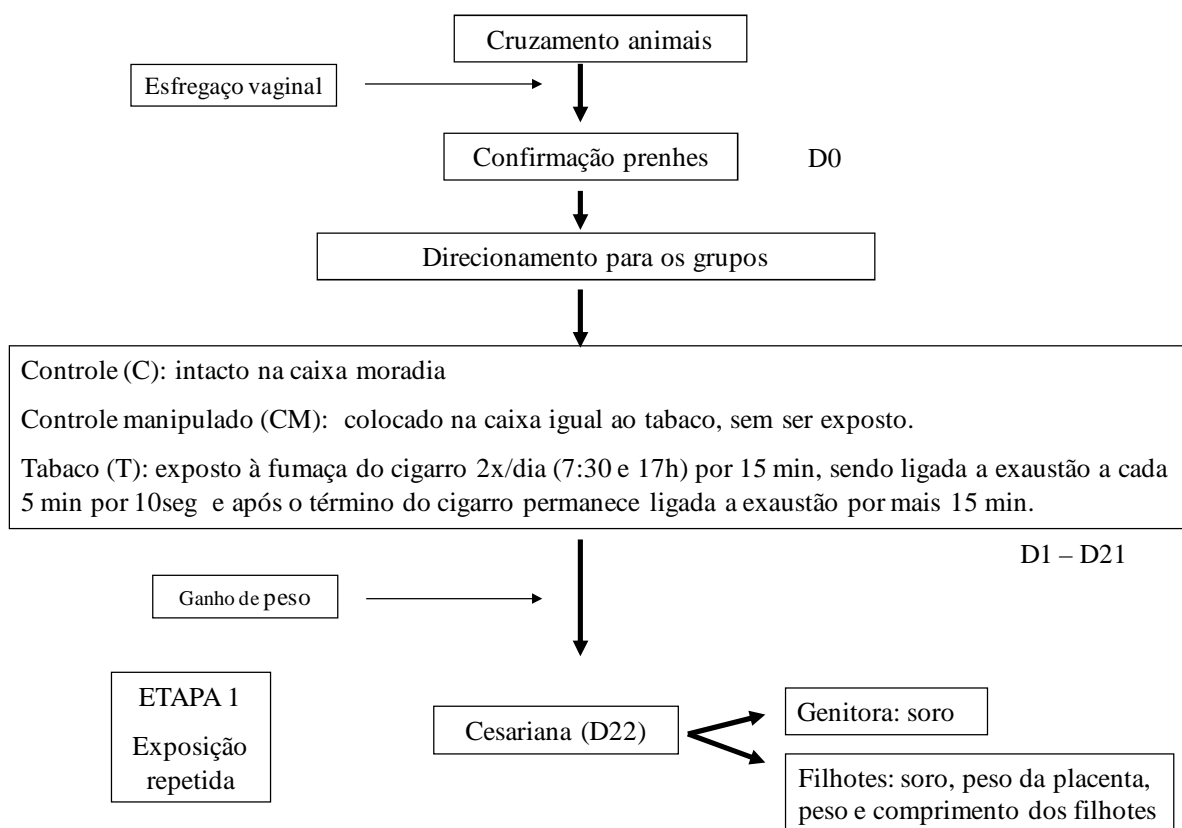
A exposição repetida ao tabaco foi acompanhada pela presença de um marcador de fase particulada, a cotinina sanguínea, um metabólito da nicotina com meia-vida de aproximadamente 17h.

Para isso, após de 7 dias de ambientação na Unidade de Experimentação Animal do HCPA, ratas Wistar nulíparas foram submetidas ao controle diário da fase do ciclo estral através da análise de esfregaços vaginais. As ratas que se encontravam na fase de pró-estro e estro eram expostas ao macho para acasalamento. Após o acasalamento, a observação de espermatozoides no esfregaço vaginal até vinte e quatro horas após a exposição ao macho foi considerado como início da prenhez (D0 de gestação) e as ratas, então, foram separadas em três grupos: controle (C), CM e T (Figura 4).

Para verificar o efeito da exposição ao tabaco durante o período gestacional sobre o desenvolvimento do feto procedeu-se a exposição ao tabaco durante os dias D1 ao D21 de gestação. O grupo T foi exposto à fumaça do cigarro duas vezes por dia às 7:30 e às 17 h por 15 minutos, durante todo o período gestacional. A maravalha da caixa-moradia localizada no compartimento de exposição foi trocada uma vez por semana. O grupo controle-manipulado foi submetido ao mesmo procedimento do tabaco, em uma caixa idêntica, mas sem ser exposto ao cigarro. O grupo C permaneceu intacto na sua caixa-moradia, sendo manipulado apenas para a pesagem semanal.

Todos os grupos de ratas prenhes tiveram seu peso aferido uma vez por semana (dia 1, dia 7, dia 14 e dia 21 de prenhez), utilizando a balança marca Marte® modelo AC 5.500 no modo animal. O consumo alimentar foi aferido uma vez por semana (dia 3, dia 10 e dia 17), utilizando a balança Marte ® com precisão de 0,01g no período de vinte e quatro horas. A quantidade consumida foi calculada a partir da diferença entre a ração oferecida e a sobra, acrescida das perdas recuperadas na limpeza do piso da caixa-

moradia. Os resultados foram expressos como consumo alimentar médio durante o período gestacional (MELLO *et al.*, 2006).



**Figura 4: Diagrama do método de exposição repetida ao tabaco durante a gestação.**

Para esse experimento foram utilizadas 15 ratas Wistar, assim divididas: 5 C, 5 CM e 5 T, totalizando o número de filhotes em 53 controles, 44 controles manipulados e 57 tabaco.

No 22º dia de gestação as genitoras foram decapitadas, o sangue do tronco coletado e o soro sanguíneo separado e armazenado a -80°C para análise da cotinina e da glicemia. Logo após, iniciou-se a cesariana para retirada dos filhotes. Os filhotes foram pesados (balança Marte® modelo AC 5.500), medidos (comprimento do focinho até o ânus) e imediatamente decapitados. O soro sanguíneo dos filhotes foi separado e armazenado para medidas bioquímicas. Suas placentas foram pesadas (balança Marte® modelo AC 5.500 com precisão de 0,01g) e congeladas a -80°C.

A cotinina no soro das genitoras foi avaliada no HCPA segundo a técnica descrita por Petersen *et al.* (2010), no aparelho de por *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC/UV), modelo Shimadzu®.

Os níveis de glicose no soro das genitoras foram avaliados no Laboratório de Análises Clínicas do HCPA pelo método enzimático colorimétrico. A glicemia e a insulinemia no soro dos filhotes foram medidas por método colorimétrico e ELISA usando Kits comerciais Glicose HK *Liquiform* (Labtest)® e Rat/mouse Insulin Elisa Kit (Millipore, Missouri, USA)® respectivamente, segundo instruções do fabricante.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Projeto 09-285). Os tratamentos dos animais foram feitos seguindo as recomendações do *International Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS).

O presente estudo não apresentou conflitos de interesse.

### 6.3 ETAPA 2

Para verificar o efeito da exposição ao tabaco durante o período gestacional sobre o ganho de peso até a vida adulta e, nessa fase, verificar o impacto em alguns parâmetros metabólicos procedeu-se a exposição à fumaça do tabaco durante a prenhez das genitoras, e realizou-se o acompanhamento dos filhotes até a vida adulta (figura 5).

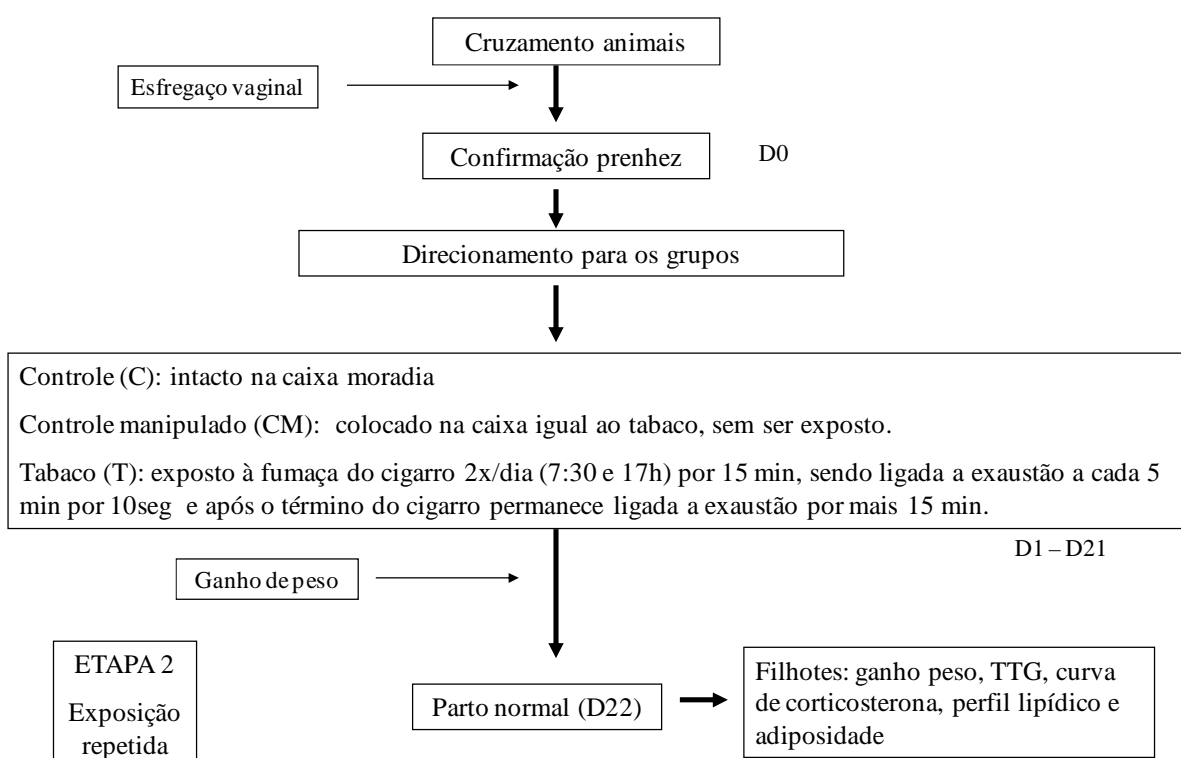
Nessa etapa foram realizados os mesmos procedimentos da etapa 1, referente à exposição repetida ao tabaco durante a prenhez, no entanto, no 22º de gestação as ratas tiveram seus filhotes de parto normal. O monitoramento dos nascimentos foi feito diariamente duas vezes ao dia às 8h e às 19h. Caso se observasse a rata com todos os filhotes, não mais parindo, a ninhada era pesada, sexada e padronizada em oito filhotes/ninhada. O dia do nascimento foi considerado o dia zero (D0), sendo o controle de

peso realizado uma vez por semana no dia do nascimento e nos dias 7 (D7), 14 (D14) e 21 (D21) de vida. As ninhadas foram desmamadas e separadas por sexo no D21 pós-natal. Após o desmame, 3 a 5 animais foram mantidos em caixa-moradia sendo pesados semanalmente (balança Marte ® modelo AC 5.500 modo animal) até o dia 77º de vida. As caixas-moradia eram limpas uma vez por semana.

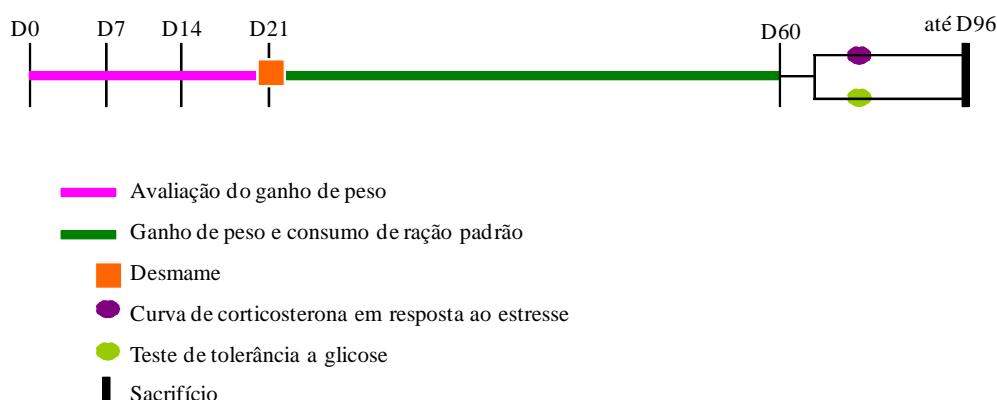
Foram utilizadas no total 15 genitoras assim divididas: 5 C, 5 CM e 5 T, totalizando 58 filhotes do grupo C, 54 filhotes do grupo CM e 64 filhotes do grupo T. A figura 6 apresenta a linha do tempo dos testes realizados nesta etapa.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os tratamentos dos animais foram feitos seguindo as recomendações do *International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)*.

Para todos os testes realizados foram usados no máximo 2 animais/ninhada, os quais foram submetidos a, no máximo, 2 testes.



**Figura 5: Diagrama do método geral da etapa 2.**



**Figura 6: Linha do tempo dos testes realizados na etapa 2.**

### 6.3.1 Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento

Entre os 77 e os 83 dias de vida, um subgrupo de 20 de animais foi submetido a esse experimento. Os animais foram envoltos em uma toalha e tiveram 3mm da ponta de sua cauda cortada com um bisturi. Um pequeno volume de sangue (aproximadamente 0,15mL) foi coletado da cauda do animal, realizando massagens suaves da base até a ponta da cauda. Após a coleta, os animais foram rapidamente imobilizados em um tubo plástico com diâmetro variável fixado com fita adesiva de forma a restringir a mobilidade dos grandes grupos musculares, sendo uma das extremidades abertas de forma a permitir a entrada de ar. Os animais ficaram imobilizados por 20 minutos e amostras adicionais de sangue foram obtidas ao final da imobilização e aos 20, 40, 70 e 100 minutos subsequentes (TANNENBAUM *et al.*, 1997). As amostras sanguíneas foram coletadas em *ependorfs* entre 14h e 17h, centrifugadas a 4000 rotações por minuto (rpm) por 11 minutos e o soro foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem analisados. Os níveis de corticosterona foram avaliados usando o Kit comercial EIA Kit *Enzo Life Sciences Int'l Inc., Plymouth Meeting, PA, USA*® .

### 6.3.2 Curva do teste de tolerância a glicose

Entre os 85 e 90 dias de vida, 55 animais representativos de cada grupo e sexo foram submetidos a esse experimento. Os animais permaneceram em jejum por 6 horas até o momento do teste. Os testes foram realizados entre 13h e 15h. A glicemia foi medida no jejum e definida como glicemia do tempo 0 (zero). Após este procedimento, os animais receberam por gavagem 2g/Kg de glicose 50%. A glicemia foi então medida nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após administração da glicose (adaptado de SZETO *et al.*, 2008 (SZETO *et al.*, 2008)). Os valores de glicemia foram obtidos através de fitas reagentes (*Optium Point of Care, Abbott*)<sup>®</sup> acopladas a um glicosímetro digital portátil (*Medisense, Optium, Abbott*)<sup>®</sup> a partir de amostras de sangue coletadas da cauda.

### 6.3.3 Coleta de material biológico

A coleta de tecidos foi realizada após o término dos testes bioquímicos, entre o 82º e 94º dias de vida dos animais. No dia do sacrifício os animais permaneceram em jejum por no mínimo 6 horas. O sangue do tronco foi coletado para determinação dos níveis sanguíneos de glicose, colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (TG). As amostras de sangue foram centrifugadas a 4000 rpm por aproximadamente 12 minutos e o soro separado e armazenado a -80°C até o dia das análises. Os níveis sanguíneos de glicose, CT, HDL e TG foram determinados no Laboratório de Análises Clínicas do HCPA por método enzimático colorimétrico e os níveis de LDL foram estimados através da equação de Friedewald.

A quantificação da adiposidade abdominal foi feita após a decapitação do animal, por meio da dissecação das duas maiores porções da gordura abdominal, peri-gonadal e retroperitoneal (DA S BENETTI *et al.*, 2007). Depois de dissecadas foram pesadas usando



balança da marca Marte® modelo AC 5.500 com precisão de 0,01g. Os resultados da quantidade da adiposidade abdominal foram expressos como percentual do peso corporal.

#### 6.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados coletados foram computados e analisados no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 18.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, EUA).

Os dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM).

Para a análise da carboxihemoglobina foi utilizado o teste t de *Student*.

Para avaliar o consumo de ração padrão durante prenhez foi realizado uma análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas. Para a análise da glicemia das genitoras utilizou-se a ANOVA, utilizando como covariável o número de filhotes da ninhada.

Para a análise do peso ao nascer, comprimento ao nascer, peso da placenta, porcentagem da placenta em relação ao peso do filhote ao nascer, glicemia e insulinemia dos filhotes foi utilizado o teste *Generalized Estimating Equations* (GEE), usando como covariável o sexo do filhote, o número de filhotes da ninhada e a origem da mãe. O GEE também foi utilizado para analisar o ganho de peso durante a gestação, tendo como covariável o número de filhotes por ninhada.

Quando se avaliou o peso ao nascer dos filhotes na segunda etapa do trabalho também se utilizou o GEE usando como covariável o número de filhotes da ninhada e a sua proporção de fêmeas. Para analisar o ganho ponderal dos filhotes após o nascimento até a vida adulta utilizou-se a ANOVA de medidas repetidas utilizando como fatores o grupo e o sexo. Para a análise da adiposidade abdominal, teste de tolerância à glicose, curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento e análises bioquímicas foi utilizado ANOVA de duas vias utilizando como fatores o grupo e o sexo. Para o cálculo da área sob a curva do

teste de tolerância a glicose utilizou-se a fórmula:  $AUC = (30 \times ((t_0+t_{30})/2) + 30 \times ((t_{30}+t_{60})/2) + 30 \times ((t_{60}+t_{90})/2) + 30 \times ((t_{90}+t_{120})/2))/120$ . Para o cálculo da área sob a curva de corticosterona em resposta ao estresse a fórmula utilizada foi:  $AUC = (20 \times ((t_0+t_{20})/2) + 20 \times ((t_{20}+t_{40})/2) + 20 \times ((t_{40}+t_{60})/2) + 30 \times ((t_{60}+t_{90})/2) + 30 \times ((t_{90}+t_{120})/2))/120$ .

O tamanho da amostra variou conforme o experimento. Para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 de desvio padrão (magnitude de efeito grande), considerando  $P = 0,05$  e poder de confiança de 90%, foram necessários 10 animais por experimento. Para os experimentos bioquímicos foi calculado um tamanho de amostra de 6 a 8 animais por grupo.

Algumas análises bioquímicas tiveram seu tamanho de amostra reduzido devido à perda de material durante a análise e/ou necessidade de refazer alguma análise. Assim como, as genitoras que tiveram filhotes mortos e/ou malformados (1 rata do grupo controle e 2 ratas do grupo tabaco) foram excluídas do estudo pela dificuldade de aferir o peso médio da ninhada.

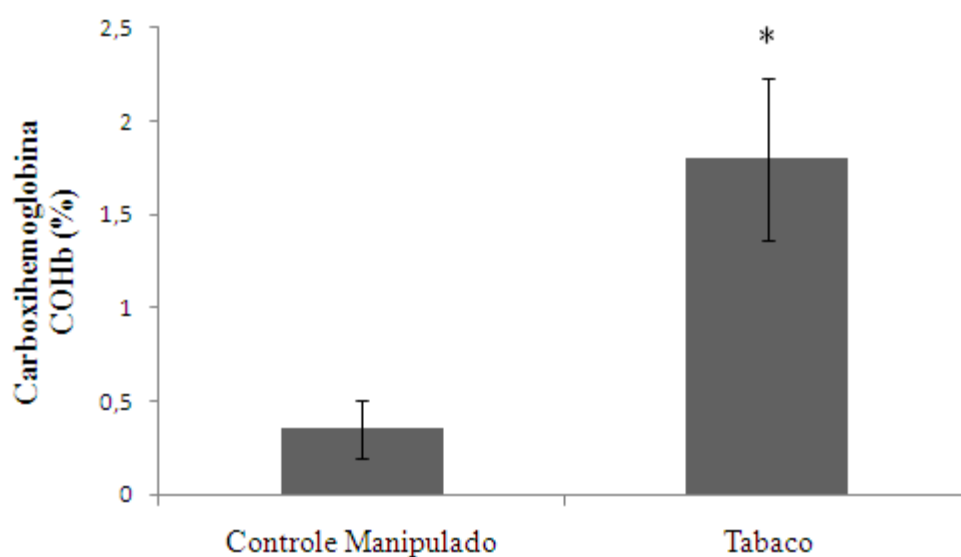
## 7 RESULTADOS

### 7.1 RESULTADOS DA ETAPA 1

#### 7.1.1 Exposição aguda

##### 7.1.1.1 Carboxihemoglobina

A análise da carboxihemoglobina pelo teste t mostrou que o grupo exposto ao tabaco de forma aguda apresentou níveis significativamente maiores de COHb que o grupo controle manipulado (figura 7).

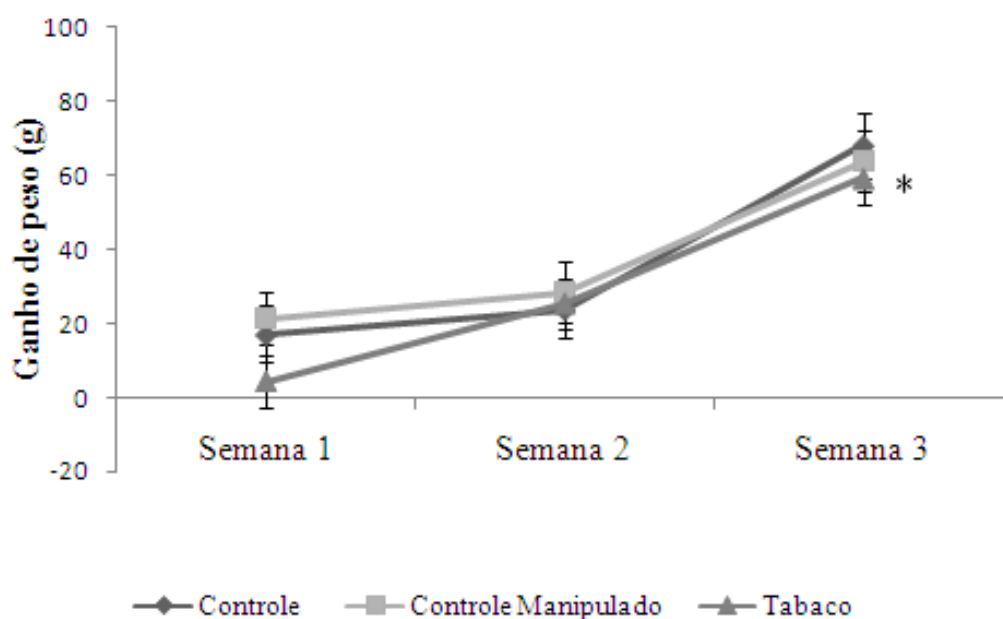


**Figura 7: Níveis de carboxihemoglobina entre os grupos tabaco e controle manipulado após intervenção (teste t, mostrando efeito da exposição ao tabaco sobre a carboxihemoglobina,  $P < 0,0001$ ,  $n=6/\text{grupo}$ ).**

#### 7.1.2 Exposição repetida

##### 7.1.2.1 Ganho de peso das genitoras durante a prenhez

Para avaliar o ganho de peso durante a prenhez foram utilizadas 31 ratas Wistar, assim divididas: 11 C, 11 CM, 9 T. A análise por *GEE*, considerando o ganho de peso durante as três semanas de prenhez, utilizando o número de filhotes como covariável, demonstrou que todas as genitoras ganharam peso com o passar do tempo ( $P < 0,0001$ ), no entanto, o grupo T tem um padrão de ganho de peso significativamente diferente dos demais grupos (Bonferroni,  $P = 0,002$ ) como mostra a figura abaixo.



**Figura 8: Ganho de peso durante as 3 semanas de prenhez entre os grupos Controle (n=11), Controle Manipulado (n=11) e Tabaco (n=9). *GEE* mostrou efeito do tempo ( $P < 0,0001$ ) e do grupo (\* $P = 0,002$ ).**

#### 7.1.2.2 Consumo de ração padrão durante a prenhez

Em relação ao consumo de ração padrão durante a prenhez a ANOVA de medidas repetidas, usando como covariável o número de filhotes da ninhada, mostrou que todos aumentaram o consumo no decorrer do tempo ( $P = 0,049$ ) como apresentado na tabela 1, mas não houve diferença entre os grupos ( $P = 0,397$ ).

**Tabela 1: Consumo de ração padrão ao longo das 3 semanas de prenhez**

<b>Grupos</b>	<b>Semana 1(g)</b>	<b>Semana 2(g)</b>	<b>Semana 3(g)</b>
Controle (n =8)	20,16 ± 2,82	30,27 ± 16,11	25,56 ± 5,08
Controle manipulado (n =11)	20,80 ± 2,98	22,01 ± 3,08	25,04 ± 1,49
Tabaco (n =9)	20,39 ± 3,46	21,28 ± 2,79	30,54 ± 11,61

ANOVA de medidas repetidas, usando como covariável o número de filhotes da ninhada, mostrou efeito do tempo ( $P=0,049$ ) e sem diferença entre os grupos ( $P=0,397$ ). Dados expressos em média ± DPM.

#### 7.1.2.3 Cotinina

Os animais expostos passivamente à fumaça do tabaco apresentaram concentração média de cotinina de 42,52 ng/mL, enquanto os animais do grupo controle e controle manipulado apresentaram valores inferiores ao limite de detecção do método, que era de 10 ng/mL (tabela 2).

**Tabela 2: Concentração de cotinina no soro**

<b>Grupos</b>	<b>Cotinina (ng/mL)</b>
Controle	< 10
Controle Manipulado	< 10
Tabaco	42,52 ± 4,33

Dados expressos em média ± DPM. n= 4 a 5/grupo.

#### 7.1.2.4 Glicemia das genitoras

Conforme apresentado na tabela 3, os dados relativos à média da glicemia das genitoras não diferiram entre os grupos (ANOVA, usando como covariável o número de filhotes da ninhada,  $P= 0,380$ ).

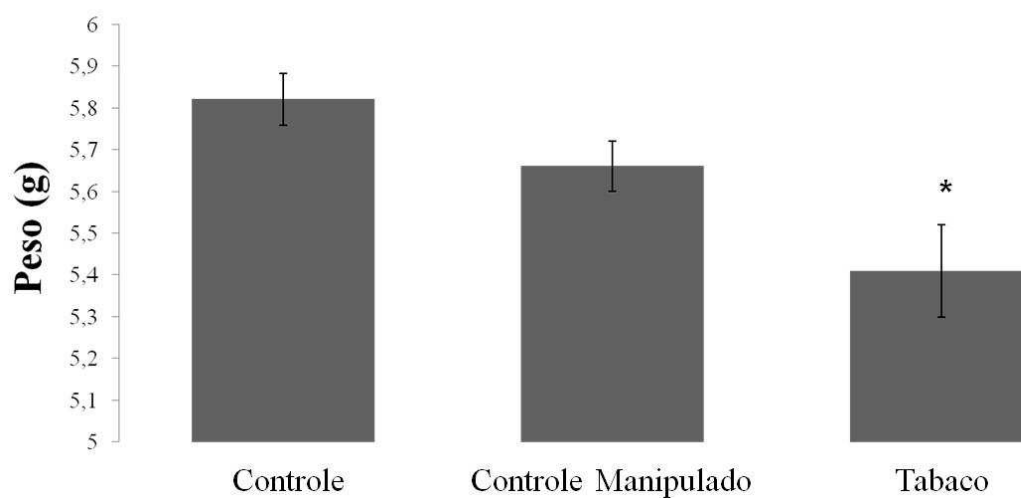
**Tabela 3: Glicemia materna**

<b>Grupos</b>	<b>Glicemia (mg/dL)</b>
Controle (n=5)	90,77 ± 5,15
Controle Manipulado (n=4)	79,37 ± 7,49
Tabaco (n=5)	94,0 ± 6,17

ANOVA, usando como covariável o número de filhotes da ninhada, não mostrou efeito do grupo ( $P= 0,380$ ). Dados expressos em média ± DPM.

#### 7.1.2.5 Peso ao nascer

Ao analisar o peso médio ao nascer por *GEE*, utilizando como co-variáveis o número de filhotes da ninhada, o sexo dos filhotes e a origem da genitora, observou-se efeito do grupo. O grupo exposto ao T no período intrauterino apresentou peso médio ao nascer significativamente inferior aos demais grupos, como mostra a figura 9.



**Figura 9: Peso médio ao nascer dos filhotes dos grupos C, CM e T (*GEE*, utilizando como covariáveis o número de filhotes da ninhada, o sexo dos filhotes, a origem da genitora, \*  $P=0,005$ ,  $n=44-57$  filhotes/grupo).**

#### 7.1.2.6 Comprimento ao nascer, peso da placenta e percentual da placenta em relação ao peso do filhote

Em relação ao comprimento ao nascer, peso total da placenta e porcentagem da placenta em relação ao peso do filhote, analisados por *GEE* e levando em consideração o sexo dos filhotes, o número de filhotes da ninhada e a origem da mãe como covariáveis, não foi observada diferença entre os grupos, como apresentado na tabela 4.

**Tabela 4: Análise das variáveis relacionadas à biometria fetal: comprimento ao nascer, peso da placenta e percentual da placenta em relação ao peso do filhote**

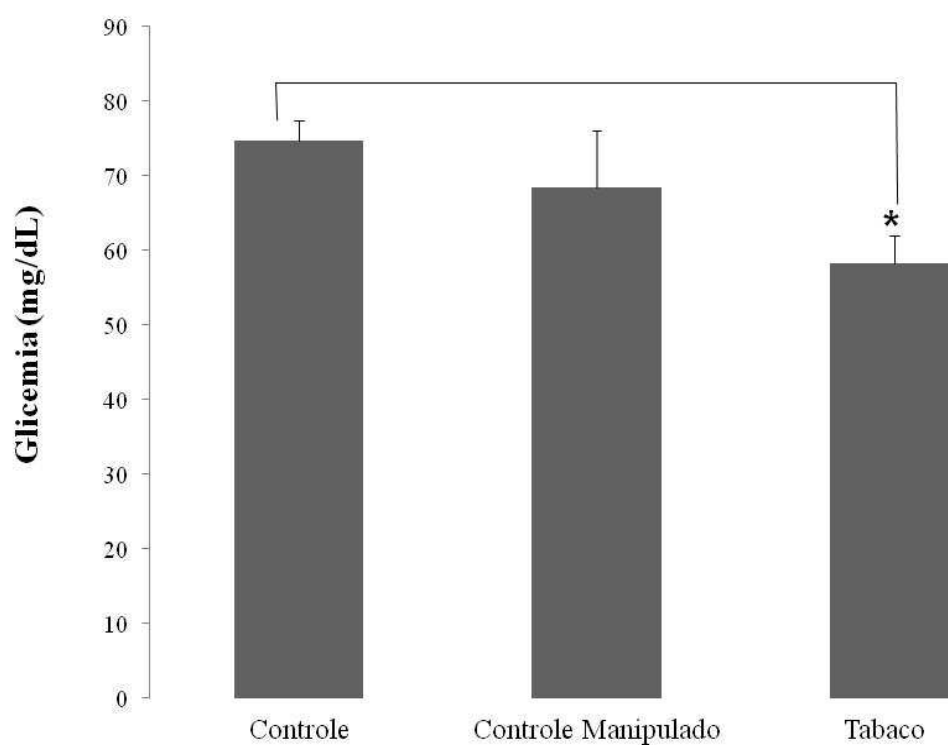
Variáveis	Controle (n=53)	Controle Manipulado (n=44)	Tabaco (n= 57)	Valor <i>P</i>
Comprimento (cm)	4,59 ± 0,30	4,58 ± 0,47	4,57 ± 0,46	0,896
Peso da placenta (g)	0,471 ± 0,02	0,475 ± 0,01	0,417 ± 0,02	0,209
Peso da placenta em relação ao peso do filhote (%)	8,12 ± 0,32	8,47 ± 0,35	7,7 ± 0,48	0,478

*GEE*, usando como covariável o sexo dos filhotes, o número de filhotes da ninhada e a origem da genitora. Dados expressos em média ± DPM.

#### 7.1.2.7 Glicemia dos filhotes

A figura 10 mostra que os animais que foram expostos ao tabaco no período intrauterino apresentaram glicemia significativamente inferior à do grupo C e não diferiram do grupo CM, conforme analisado por *GEE* usando como co-variáveis o número de filhotes ninhada, o sexo dos filhotes, a origem da genitora e o peso médio ao nascer.

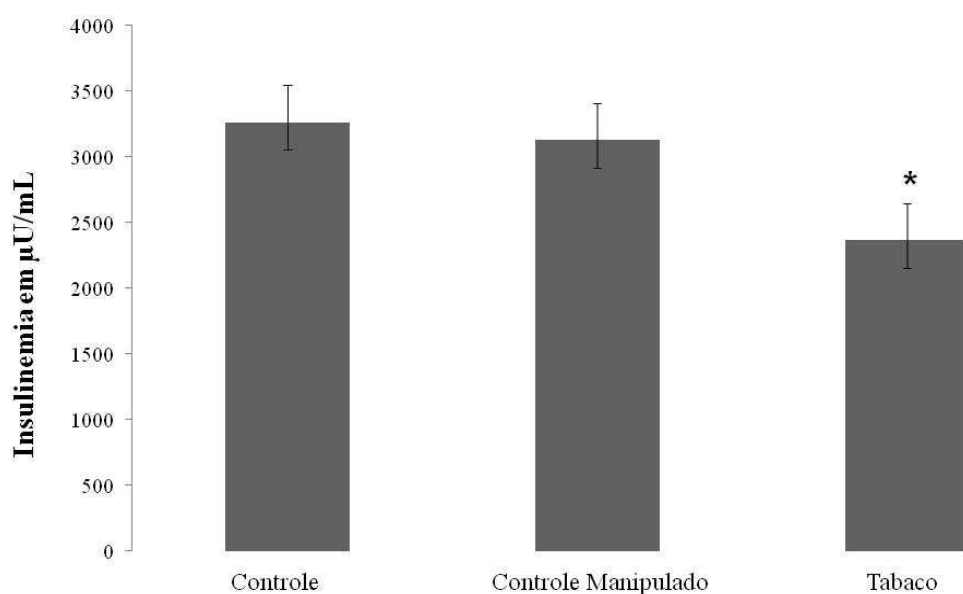




**Figura 10: Glicemia (mg/dL) dos filhotes entre os grupos C, CM e T. *GEE*, usando como covariável o sexo dos filhotes, o número de filhotes da ninhada e a origem da mãe, \*  $P < 0,0001$ ,  $n = 11$  filhotes/grupo).**

#### 7.1.2.8 Insulinemia dos filhotes

Ao analisar a insulinemia dos filhotes verificou-se que o grupo T apresentou níveis significativamente inferiores aos demais grupos (*GEE*, usando como co-variáveis o número de filhotes da ninhada, o sexo dos filhotes, a origem da genitora e o peso médio ao nascer,  $p = 0,009$ ), como apresentado na figura 11.



**Figura 11: Insulinemia ( $\mu\text{U}/\text{mL}$ ) dos filhotes entre os grupos C, CM e T. *GEE*, usando como co-variáveis o número de filhotes da ninhada, o sexo dos filhotes, a origem da genitora e o peso médio ao nascer, \*  $P = 0,009$ ,  $n = 11$  filhotes/grupo).**

## 7.2 RESULTADOS DA ETAPA 2

### 7.2.1 Peso ao nascer

Ao analisar o peso médio ao nascimento dos animais que nasceram de parto normal (*GEE*, usando como co-variáveis o número de filhotes da ninhada e a proporção de fêmeas da ninhada) não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,718$ ), como apresentado na tabela 5.

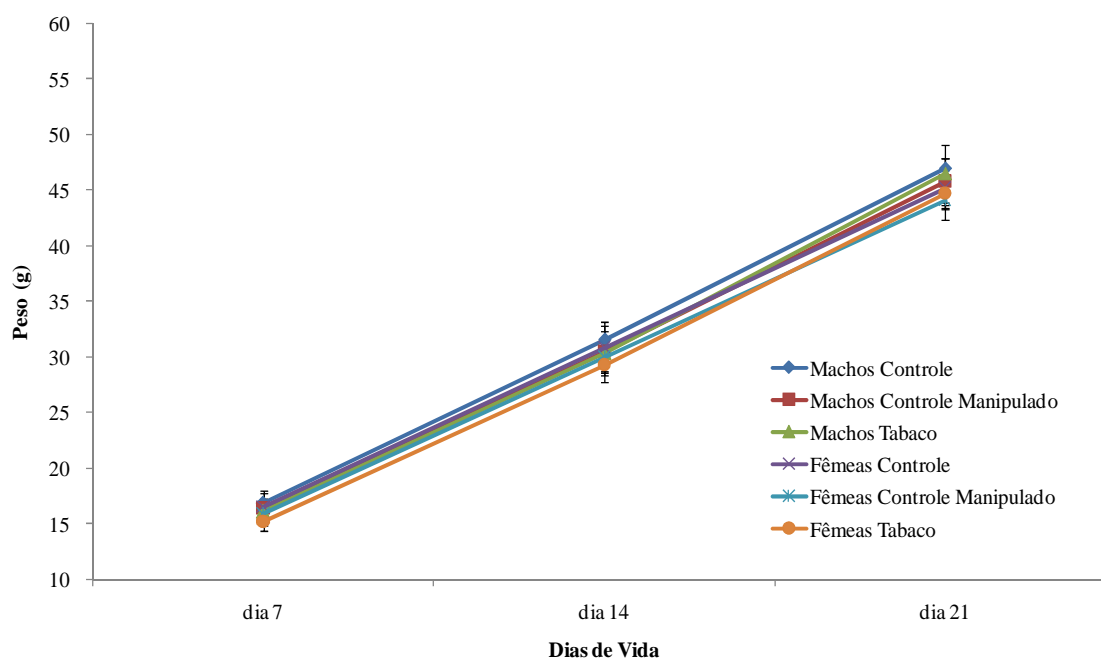
**Tabela 5: Peso médio da ninhada ao nascer**

Grupo	Peso (g)
Controle	6,32±0,08
Controle manipulado	6,34±0,11
Tabaco	6,23±0,09

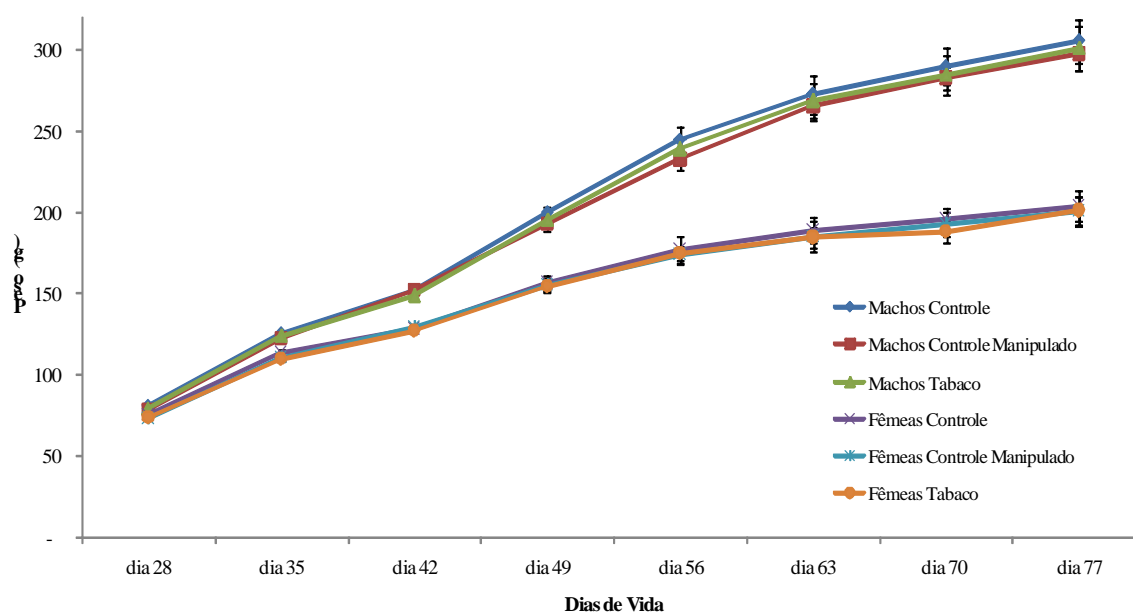
*GEE*, usando como covariáveis o número de filhotes da ninhada e a proporção de fêmeas da ninhada,  $P = 0,718$ ,  $n = 5/\text{grupo}$ . Dados expressos em média  $\pm$  DPM.

## 7.2.2 Acompanhamento do ganho de peso

Em relação ao ganho de peso entre os dias 7 e 21 pós-natais, a ANOVA de medidas repetidas (utilizando o sexo e grupo como fatores e o peso médio da ninhada por sexo como covariável) demonstrou que todos os animais ganharam peso ao longo do tempo ( $P < 0,0001$ ). Também se observou efeito do sexo ( $P = 0,03$ ), no qual os machos pesaram mais que as fêmeas. Não houve diferença significativa entre os grupos ( $P = 0,718$ ), como ilustra a figura 12A. Após os 21 dias de vida os animais foram desmamados e o ganho de peso individual foi observado ao longo de 8 semanas. A análise dos resultados mostra que os animais continuaram a ganhar peso com o passar do tempo (ANOVA de medidas repetidas utilizando grupo e sexo como fatores,  $P < 0,0001$ ). O efeito do sexo foi mantido ( $P < 0,0001$ ) confirmando que os machos permaneceram mais pesados que as fêmeas com o decorrer do tempo. Não se observou efeito do grupo ( $P = 0,159$ ), como apresentado na figura 12B.



**Figura 12A:** Ganho de peso corporal entre o 7º e o 21º dia de vida pós-natal nos machos controle (n=19), machos controle manipulado (n=20), machos tabaco (n=20) e fêmeas controle (n=21), fêmeas controle manipulado (n=20) e fêmeas tabaco (n=19). Dados expressos em média  $\pm$  DPM. ANOVA de medidas repetidas até o dia 21 de vida mostrou que todos os animais ganharam peso com o passar do tempo ( $P < 0,0001$ ). Análise também mostrou efeito do sexo ( $P=0,03$ ).



**Figura 12B:** Ganho de peso corporal ao longo de 8 semanas de vida após o desmame, nos machos controle (n=19), machos controle manipulado (n=20), machos tabaco (n=20) e entre as fêmeas controle (n=21), fêmeas controle manipulado (n=20) e fêmeas tabaco (n=19). Dados expressos em média  $\pm$  DPM. ANOVA de medidas repetidas após o desmame mostrou que todos os animais ganharam peso com o passar do tempo ( $P < 0,0001$ ). A diferença entre os sexos tornou-se mais evidente ( $P < 0,001$ ).

### 7.2.3 Quantificação da adiposidade abdominal

A análise da adiposidade abdominal como percentual de peso corporal foi realizada através da ANOVA de duas vias, utilizando grupo e sexo como fatores. Foi observado efeito do sexo no percentual de gordura retroperitoneal ( $P < 0,001$ ) e também na adiposidade total ( $P < 0,001$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos nesses parâmetros, conforme apresentado na tabela 6.

**Tabela 6: Adiposidade abdominal**

% gordura	Controle		Controle Manipulado		Tabaco	
	macho (n=19)	fêmea (n=20)	macho (n=20)	fêmea (n=20)	macho (n=21)	fêmea (n=19)
Retroperitoneal	1,19 ± 0,35 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,40 <sup>b</sup>	1,15 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,24 <sup>b</sup>	1,34 ± 0,39 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,24 <sup>b</sup>
Perigonadal	1,19 ± 0,24	1,31 ± 0,42	1,20 ± 0,23	1,34 ± 0,35	1,27 ± 0,27	1,26 ± 0,36
Adiposidade total	7,63 ± 1,97 <sup>a</sup>	4,58 ± 1,47 <sup>b</sup>	7,60 ± 1,78 <sup>a</sup>	4,40 ± 1,09 <sup>b</sup>	8,54 ± 2,31 <sup>a</sup>	4,45 ± 1,08 <sup>b</sup>

ANOVA de duas vias,  $P > 0,05$  para grupo e sexo. Valores expressos em média ± DPM; <sup>a,b</sup> letras diferentes significam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ).

#### 7.2.4 Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento: dados preliminares

A análise do teste de corticosterona mostrou que tanto no estado basal ( $P = 0,895$ ) como no pico da liberação desse hormônio ( $P = 0,582$ ), os valores não diferiram entre os grupos. Também não houve diferença na área sob a curva de concentração de corticosterona (AUC = 0 a 120 minutos;  $P = 0,40$ ), conforme apresentado na tabela 7. No entanto, foi observada diferença em relação ao sexo no estado basal ( $P = 0,004$ ) e na área sob a curva de concentração de corticosterona ( $P = 0,001$ ). Esse efeito não foi observado no pico de liberação de corticosterona ( $P = 0,071$ ).

**Tabela 7: Área sob a curva de corticosterona (ng/mL)**

	Controle	Controle Manipulado	Tabaco	valor $P$ grupo	valor $P$ sexo
<b>Macho</b>	81.618 ± 40.914,75	44.182 ± 9.309,3	78.263 ± 39.656,76	0,400	0,0001
<b>Fêmea</b>	106.994 ± 4.630,82	103.579 ± 30.047,19	149.900 ± 56.038,35		

ANOVA de duas vias, não mostrou efeito do grupo, verificou-se efeito do sexo,  $n = 2$  a 5/grupo/sexo. Valores expressos em média ± DPM.

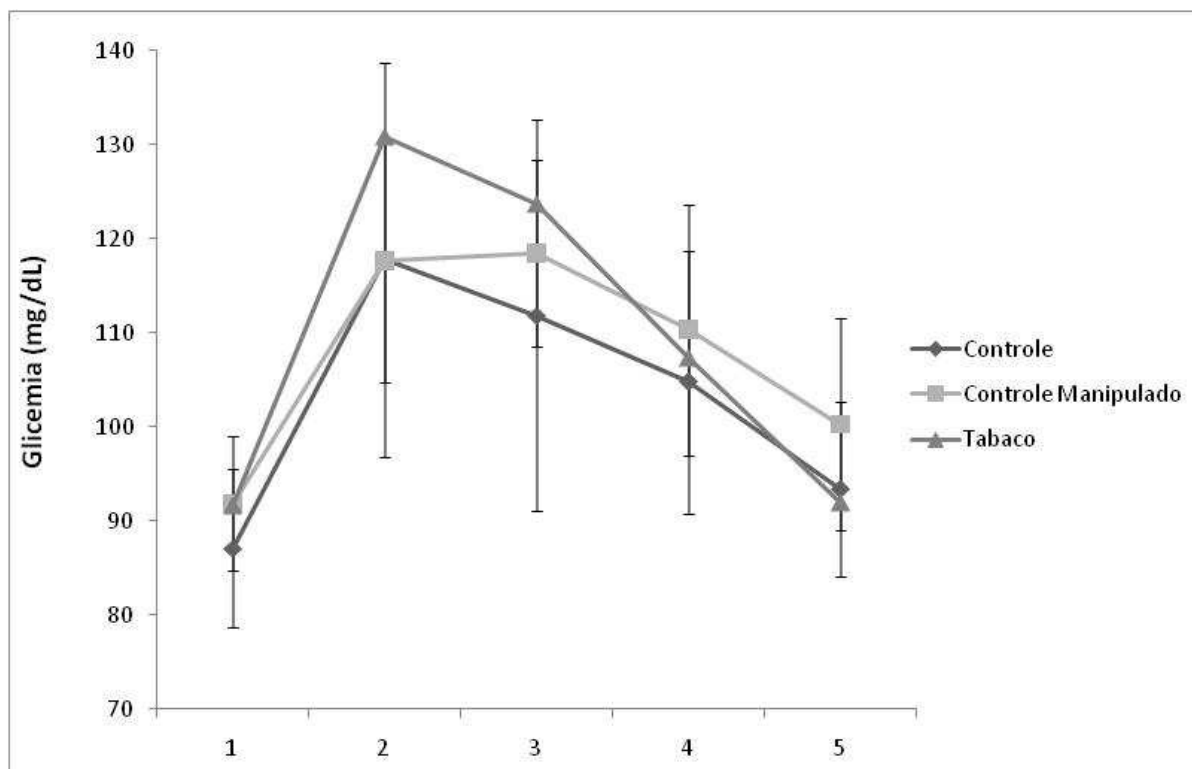
### 7.2.5 Curva do teste de tolerância a glicose

Ao avaliar o teste de tolerância à glicose observou-se que a glicemia no basal não diferiu entre os grupos ( $P=0,109$ ) nem entre o sexo ( $P=0,177$ ). Foi observada diferença entre os grupos no pico glicêmico ( $P=0,03$ ; grupo tabaco difere dos grupos controle e controle manipulado), como apresentado na tabela 8. Também foi observado efeito na área sob a curva de concentração de glicose (AUC = 0 a 120 minutos;  $P= 0,045$ ), no qual o grupo tabaco difere do grupo controle ( $P=0,042$ ), mas não do grupo controle manipulado ( $P=1,00$ ), como ilustra a figura 13. Todas as análises foram feitas utilizando ANOVA de duas vias, usando como fatores o grupo e o sexo.

**Tabela 8: Teste de tolerância a glicose no basal e no pico glicêmico**

	Controle		Controle Manipulado		Tabaco	
	macho (n=7)	fêmea (n=10)	macho (n=9)	fêmea (n=10)	macho (n=9)	fêmea (n=10)
Glicemia no basal (mg/dL)	83,4 ± 8,98	89,7 ± 10	89,1 ± 7,0	94,4 ± 6,5	93,0 ± 8,5	90,6 ± 7,8
Pico glicêmico (mg/dL)	114 ± 9,5	128 ± 4,8	125 ± 11,8	125 ± 7,2	133 ± 21,1	140 ± 19,3

ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o grupo e o sexo, não mostrou efeito do grupo ( $P= 0,109$ ) nem do sexo ( $P= 0,177$ ) no basal. Observado efeito do grupo no pico glicêmico ( $P= 0,03$ ), sem efeito do sexo ( $P= 0,065$ ). Valores expressos em média ± DPM.



**Figura 13:** Teste de tolerância a glicose entre os grupos controle (n=17), controle manipulado (n=19) e tabaco (n=19). Dados expressos em média  $\pm$  DPM. ANOVA de duas vias demonstrou efeito do grupo,  $P= 0,045$ , sem efeito do sexo ( $P= 0,069$ ). Tempos: (1 = basal; 2 = 30 minutos; 3 = 60 minutos; 4 = 90 minutos e 5 = 120 minutos)

### 7.2.6 Perfil bioquímico

A análise do perfil lipídico (CT, LDL, HDL e TG) mostrou efeito do sexo ( $P < 0,05$ ), mas não dos grupos ( $P > 0,05$ ) em todos os parâmetros analisadas.

Os níveis de glicose no soro não diferiram entre os sexos ( $P= 0,241$ ), nem entre os grupos ( $P= 0,288$ ). A tabela 9 apresenta os valores médios de cada parâmetro de acordo com o grupo e o sexo. Todas as análises foram feitas utilizando ANOVA de duas vias, usando como fatores o grupo e o sexo.

**Tabela 9: Parâmetros bioquímicos na vida adulta**

Variável	Controle		Controle Manipulado		Tabaco	
	macho (n=7)	fêmea (n=10)	macho (n=5)	fêmea (n=10)	macho (n=5)	fêmea (n=9)
CT (mg/mL)	58,0±9,07	72,2±8,04	55,6±4,16	69,3±10,45	67,8±6,61	71,0±14,34
HDL (mg/mL)	19,57±4,57	25,0±2,75	18,6±1,82	24,4±3,50	21,2±1,64	23,8±4,32
LDL (mg/mL)	12,0 ± 3,34	32,2 ± 4,98	15,0 ± 4,15	31,1 ± 7,70	22,9 ± 7,18	30,4±11,09
TG (mg/mL)	131,7±8,7	75,1±7,25	110,0±0,20	68,8±7,25	118,6±10,2	84,2±7,60
Glicose (mg/dL)	129,4±13,2	125,4±30,1	130,4±3,6	138,4±8,3	129,6±8,4	143,8±9,7

ANOVA de duas vias, usando como fatores o grupo e o sexo. Não foi observada diferença entre os grupos em todos os parâmetros analisados ( $P > 0,05$ ). Houve efeito do sexo no perfil lipídico ( $P < 0,05$ ), mas não na glicose. Valores expressos em média  $\pm$  DPM.



## 8 DISCUSSÃO

### 8.1. ETAPA 1

O presente estudo visou validar um método experimental de exposição ao tabaco durante a gestação que estivesse associado à restrição de crescimento intrauterino. O modelo foi bem sucedido ao induzir menor peso ao nascer, assim como hipoglicemia e hipoinsulinemia amplamente descritos em associação com a RCIU.

Diversos métodos de exposição ao tabaco estão descritos, sendo que eles variam amplamente em relação à forma de exposição (corpo inteiro ou somente nasal), tempo de exposição (agudo ou crônico), diferentes intervalos ao longo do dia, e em que momento da prenhez iniciou a exposição ao tabaco. Todos os modelos propostos apresentam alguma limitação, como, por exemplo: administração oral de nicotina sem considerar os demais constituintes do tabaco e tampouco a sua via de administração (SLOTKIN, 1998; WICKSTROM, 2007), ou a exposição à fumaça de um cigarro de referência, produzido pela Universidade de *Kentucky*, cuja constituição não contém os 600 aditivos presentes nos cigarros comercializados e consumidos pela população (RAJINI *et al.*, 1994; CARMINES *et al.*, 2003; FARKAS *et al.*, 2006).

O método escolhido para desenvolver este estudo foi o da exposição passiva na qual o animal é exposto à fumaça lateral do cigarro (GONÇALVES-SILVA *et al.*, 1997; MELLO *et al.*, 2005). Este método expõe os animais a todos os constituintes presentes no tabaco, além de mimetizar a inalação à qual os seres humanos são submetidos de forma passiva. Ainda, é um modelo de baixo custo e fácil reprodutibilidade.

Neste estudo foram utilizados dois marcadores de exposição ao tabaco: a COHb e a cotinina. Segundo SCHERER e RICHTER (1997) a COHb provou ser um biomarcador útil de exposição aguda à fumaça do tabaco sob condições experimentais bem definidas. Em

tabagistas, a COHb é um marcador da fase gasosa do cigarro e a quantidade absorvida de CO depende da quantidade de cigarros fumados nas últimas horas e da duração da exposição (MELLO *et al.*, 2005). O grupo exposto ao tabaco de forma aguda teve 1,8% ( $\pm$  0,43) de COHb, enquanto o grupo controle manipulado apresentou 0,35% ( $\pm$  0,15) de COHb. Segundo a *World Health Organization* (WHO), a COHb em não fumantes varia entre 0,5% e 2% e pode aumentar cerca de 1% se ocorrer uma exposição aguda (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003), como verificado no resultado obtido. É importante ressaltar que a quantidade de COHb é uma medida da exposição ao CO ao longo das últimas 24 horas, não sendo cumulativa, pois sua meia-vida em humanos é de 4-6h, enquanto que em ratos é de aproximadamente 42 minutos (CARMINES *et al.*, 2003; CARMINES e RAJENDRAN, 2008).

Em estudos que utilizam modelos de inalação da fumaça do tabaco o aumento da COHb no sangue deve ser realizada para demonstrar que a fase gasosa do fumo foi inalada para os pulmões. Essas medidas devem ser acompanhadas por medidas de deposição pulmonar dos constituintes da fase particulada do fumo, tal como a nicotina e cotinina no sangue (COGGINS, 2001).

A análise da cotinina é considerada o padrão-ouro na avaliação da exposição ao tabaco, embora muitos estudos utilizem outros marcadores como nicotina e/ou CO (RAJINI *et al.*, 1994; FARKAS *et al.*, 2006; ESPOSITO *et al.*, 2008). Essa variabilidade na utilização de biomarcadores observado nos modelos animais de exposição ao tabaco dificulta a comparação com os resultados da presente pesquisa. No nosso estudo a concentração média de cotinina encontrado nos animais expostos ao tabaco foi de 42,5 ng/mL, sem sinais de intoxicação aparente. Os valores de cotinina na literatura variam amplamente, de 25,15 ng/mL a 572ng/mL (MELLO *et al.*, 2005; JARDIM *et al.*, 2010; SMALL *et al.*, 2010). Muitos fatores explicam essas variações: diferentes tempos de exposição, ratas expostas

durante a prenhez ou não, diferenças nos intervalos entre uma exposição e outra, diversidade nas marcas e na quantidade de cigarros usados para a exposição, o intervalo de tempo entre a última exposição e a coleta do material e as diferentes técnicas de análise da cotinina. Os resultados encontrados de cotinina e COHb em nosso estudo permitem afirmar que o método utilizado foi efetivo em expor ao tabaco.

Em relação ao peso ao nascer dos filhotes que foram expostos ao tabaco durante o período intrauterino e nasceram por cesárea, foi observado menor peso quando comparado aos demais grupos, sendo este resultado corroborado por achados de outros autores (RAJINI *et al.*, 1994; SELLER e BNAIT, 1995; FARKAS *et al.*, 2006; CARMINES e RAJENDRAN, 2008). Um dos fatores que influenciam o peso ao nascer é o ganho de peso materno durante a gestação. O grupo exposto ao tabaco apresentou um padrão de ganho de peso materno significativamente menor que os demais grupos, o que está de acordo com a literatura (GAWORSKI *et al.*, 2004; MELLO *et al.*, 2006; CARMINES e RAJENDRAN, 2008).

Em humanos, a exposição ao tabagismo durante o período fetal se associa com redução não só do peso, mas também do comprimento ao nascer (SHANKARAN *et al.*, 2004; VARDAVAS *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011). As baixas taxas de ganho de peso materno no 2º e 3º trimestre estão significativamente associadas com menor peso ao nascer (STRAUSS e DIETZ, 1999) e o aumento do ganho de peso gestacional em tabagistas tem uma correlação positiva com o peso, o comprimento e o perímetro cefálico do feto (LUKE *et al.*, 1981).

Muitos são os fatores que podem influenciar o ganho de peso materno ao longo da gestação. No nosso estudo avaliamos o consumo de ração padrão e não observamos diferença entre os grupos, resultado também obtidos por outros autores (CARMINES *et al.*, 2003; GAWORSKI *et al.*, 2004). O estresse causado pela manipulação dos animais também

não alterou o consumo alimentar, como verificado pelo grupo controle manipulado. Alguns estudos têm demonstrado uma associação entre o tabagismo e uma disfunção da tireóide e, por conseguinte, a uma modificação no metabolismo basal (TZIOMALOS e CHARSOULIS, 2004; SOLDIN *et al.*, 2009). Esse fator não foi controlado no nosso estudo, no entanto, possivelmente a explicação para diferença no ganho de peso materno e do feto envolve uma ação direta de um ou mais constituintes do tabaco sobre o metabolismo desses animais.

Em animais, há poucos dados na literatura que relacionam o comprimento ao nascer e a exposição ao tabaco intra-útero. Rajini *et al.* (1994) utilizando a ossificação do esqueleto como estimativa do comprimento fetal não observou diferença entre o grupo exposto ao tabaco e o grupo controle. Por outro lado, Esposito *et al.* (2008), observou que camundongos expostos ao tabaco tanto de forma ativa, como passiva, apresentaram menor comprimento ao nascer. O mesmo padrão de resposta foi observado por Mello *et al.* (2007), em estudo realizado em roedores. No nosso estudo não foi verificado diferença entre os grupos em tal desfecho. Acreditamos que essa discordância de resultado possa refletir as diferenças temporais e quantitativas nas exposições ao tabaco. Além disso, como observamos alteração no peso ao nascer, mas não no comprimento podemos sugerir que a restrição do crescimento causada pela exposição ao tabaco poderia estar relacionada a uma desnutrição aguda dos animais.

Em mamíferos, o principal determinante da RCIU é o fornecimento de nutrientes para a placenta, que, por sua vez, irá depender do tamanho, da morfologia, do suprimento sanguíneo e da quantidade de transportadores de nutrientes para o feto, entre outros fatores (FOWDEN *et al.*, 2006).

Não foi verificada diferença significativa em relação ao peso da placenta. A literatura referente à exposição ao tabaco e peso placentário em roedores é escassa e controversa, ou

seja, alguns autores observaram diferença nesse parâmetro (SELLER e BNAIT, 1995; BRANDINI *et al.*, 2005) e outros não (BASSI *et al.*, 1984). Sabe-se que o peso da placenta se correlaciona com a ingestão dietética em mamíferos (BELKACEMI *et al.*, 2010), entretanto, essa variável não foi avaliada nos estudos supracitados.

Em humanos, alguns autores têm demonstrado que o tabagismo materno não está associado ao peso placentário (PICONE *et al.*, 1982; RODRIGUEZ-MORAN *et al.*, 2007). A justificativa para esse achado é que o tabagismo leva à hipóxia fetal e placentária e, dessa forma, a placenta responde compensando seu tamanho na tentativa de suprir suas demandas, (NAEYE, 1987). Neste caso, o menor peso ao nascimento pode estar relacionado com alterações estruturais e funcionais da placenta. É importante ressaltar a limitação de se comparar diferentes espécies, pois em humanos o peso da placenta aumenta progressivamente ao longo da gestação, enquanto em roedores, ele atinge um *plateau* da metade para o final da prenhez e, em seguida, declina (FOWDEN *et al.*, 2006).

Além dos parâmetros antropométricos, a RCIU é caracterizada por meio de alterações metabólicas (HENRIKSEN, 1999), sendo que baixas concentrações de insulina e de glicose são amplamente relatadas em humanos restritos (NIETO-DIAZ *et al.*, 1996; HAY, 2006; MURPHY *et al.*, 2006).

Os filhotes expostos ao tabaco apresentaram glicemia significativamente menor em relação ao grupo controle. A glicose é o principal substrato energético para o feto e para a placenta (DIDERHOLM, 2009). Em resposta à desnutrição prolongada, o feto altera a sua taxa metabólica, a produção de hormônios e a sensibilidade dos tecidos a estes (BYRNE e PHILLIPS, 2000; MARTIN-GRONERT e OZANNE, 2007). Assim, a hipoglicemia, verificada neste estudo, é uma adaptação essencial com o objetivo de promover o transporte de glicose através da placenta pelo aumento do gradiente de concentração de glicose transplacentário (THORN *et al.*, 2011). A redução de glicemia leva a uma redução de

insulina que parece ser outro mecanismo de adaptação para limitar o crescimento e, com isso, viabilizar o desenvolvimento do feto (MARTIN-GRONERT e OZANNE, 2007; THORN *et al.*, 2011). Esse padrão de resposta também pôde ser verificado pelos resultados obtidos nos animais expostos intraútero ao tabaco. Os resultados bioquímicos, acrescentando o baixo peso ao nascimento, demonstraram que a exposição ao tabaco, sob as presentes condições, produziu um pequeno, mas significativo, retardo do crescimento intrauterino.

## 8.2. ETAPA 2

Não foi observada diferença no peso ao nascer dos animais que nasceram de parto normal. Este achado pode ser atribuído ao fato dos filhotes terem sido amamentados antes de serem pesados, diferentemente daqueles nascidos por cesárea (Etapa 1), cujo peso foi aferido imediatamente ao nascimento. Gaworski *et al.* (2004) verificaram baixo peso ao nascer de ninhadas cujas mães foram expostas à baixa concentração de tabaco. Também observaram que esses filhotes fizeram *catch-up* quase que imediatamente após o parto. No presente estudo a pesagem dos animais foi feita até 12h após o parto, assim, é possível que nesse prazo tenha ocorrido o efeito *catch-up* sem que pudéssemos registrar. Essa decisão foi tomada para evitar efeitos da manipulação neonatal (DA S BENETTI *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2010). Além disso, não podemos excluir a possibilidade de que os mecanismos relacionados ao parto (ex.: secreção de diferentes hormônios durante o parto) possam ter efeitos diferenciados entre os grupos, (ex.: diferente retenção de líquidos), o que influenciaria no peso aferido. Ainda, o pequeno tamanho da amostra também pode estar relacionado com o fato de não ter sido encontrada diferença no peso ao nascer.

Com o objetivo de acompanhar o ganho de peso ao longo da vida, avaliou-se o ganho ponderal dos filhotes ao longo de 11 semanas. Não foi verificada diferença entre os grupos,

somente entre os sexos, conforme era esperado. Como já mencionado, a literatura apresenta estudos sobre o peso ao nascer de filhotes expostos ao tabaco no período intrauterino, entretanto, em nenhum deles a prole foi acompanhada durante o seu desenvolvimento (RAJINI *et al.*, 1994; FARKAS *et al.*, 2006; CARMINES e RAJENDRAN, 2008; ESPOSITO *et al.*, 2008). Um único estudo avaliou o peso ao nascer e o ganho ponderal de ratos que foram expostos à fumaça de 1 cigarro/animal/dia durante a vida fetal e durante a lactação. Nele foi verificado que os filhotes apresentaram menor peso ao nascimento e que essa diferença se manteve aos 30 e aos 60 dias de vida não ocorrendo o *catch-up* (GOMES e SERAPHIM, 2010). Estudos em humanos relatam a associação do tabagismo materno durante a gestação e o posterior desenvolvimento da obesidade, mesmo após a correção para fatores de confusão como o baixo peso (INO, 2010; INO *et al.*, 2012). Embora a recuperação do crescimento possa ser um fator para o desenvolvimento posterior da obesidade em humanos, em estudo de revisão Bergen (2006) sugere que o efeito do tabagismo materno sobre a obesidade nos filhos pode ocorrer independentemente de *catch-up*.

A adiposidade abdominal não diferiu entre os grupos, apontando um crescimento dos animais de forma proporcional. Talvez a exposição passiva relativamente pequena utilizada neste trabalho não seja capaz de produzir excesso de peso e adiposidade na vida adulta, uma vez que parece haver uma associação dose-dependente entre os níveis de tabagismo materno durante a gravidez e o aparecimento do excesso de peso (SOMM *et al.*, 2009). Shahkhalili, *et al.* (2010) comparou dois modelos de restrição de crescimento intrauterino (restrição alimentar e injeção de dexametasona) e demonstrou um rápido *catch-up* em ratos machos durante o período de aleitamento no grupo que sofreu restrição alimentar no período intrauterino, mas não encontrou diferença entre os grupos em relação ao ganho ponderal ao

longo de 22 semanas de acompanhamento pós-natal. No mesmo estudo, também não foi verificada diferença entre os grupos em relação à gordura retroperitoneal e gonadal.

É de conhecimento de todos que a obesidade é uma doença complexa e multifatorial que envolve em sua gênese fatores ambientais e genéticos (PINHEIRO *et al.*, 2004; WANDERLEY e FERREIRA, 2010). Sabe-se também que existe uma clara interação entre exposição pré-natal e ambiente pós-natal. Dessa forma, a programação pode só se tornar aparente se os filhotes forem seguidos até o período de envelhecimento, ou desafiados na vida pós-natal, como resultado de uma incompatibilidade entre a dieta pré-natal e pós-natal (MCMULLEN e MOSTYN, 2009). Ou seja, as causas pelas quais os animais não desenvolveram a obesidade poderiam ser atribuídas à ração padrão com a qual foram alimentados durante toda a vida e ao fato de seu acompanhamento ter sido feito somente até a fase de adultos jovens.

A composição corporal e o rápido ganho de peso são fatores que influenciam na sensibilidade à insulina. E, apesar de ambos não diferirem entre os grupos, a análise do teste de tolerância à glicose na vida adulta mostrou que o grupo exposto ao tabaco durante o período intrauterino apresentou resistência à ação da insulina comparado ao grupo controle. Ainda, o grupo tabaco apresentou maior pico glicêmico que os demais grupos. Tal achado sugere que o grupo exposto ao tabaco tem dificuldade na absorção da glicose em nível celular, seja por menor disponibilidade de insulina, menor número/funcionamento dos receptores de insulina ou menor capacidade de indução da cascata de sinalização intracelular que culmina com a captação de glicose. Esse achado indica que o efeito no metabolismo da glicose parece não ser mediado apenas pela obesidade ou pela adiposidade, possivelmente sendo resultado de programação metabólica fetal.

Vários autores utilizando outros métodos de RCIU também encontraram alteração no metabolismo da glicose (OZANNE e HALES, 2002; FOWDEN *et al.*, 2005; HOLLOWAY



*et al.*, 2005; MARTIN-GRONERT e OZANNE, 2007). O mecanismo pelo qual a RCIU leva à programação de DM 2 na vida adulta não é conhecido. Entretanto, tem sido associado com o desenvolvimento e a função de células beta-pancreáticas. Em ratos adultos que sofreram RCIU, verificou-se menor massa de células beta e de conteúdo de insulina no pâncreas, bem como uma resposta de insulina reduzida para glicose (SIMMONS *et al.*, 2001). Além disso, o desenvolvimento de intolerância à glicose em indivíduos que sofreram RCIU também pode estar associado com outras alterações na sinalização da insulina como, por exemplo, o transportador de glicose do tipo 4 (ROSS e BEALL, 2008). Embora uma redução na massa fetal das células beta seja relatada em diferentes modelos de RCIU, os mecanismos celulares e moleculares subjacentes que levam a esse desfecho não são os mesmos (SHAHKHALILI *et al.*, 2010). Sabe-se que a hipoglicemia e a menor secreção de insulina conduzem a níveis reduzidos de IGF-1, que, por sua vez, irão comprometer o desenvolvimento muscular (MARTIN-GRONERT e OZANNE, 2007). Os indivíduos com baixo peso também parecem apresentar alterações na composição das fibras musculares o que pode contribuir com o desenvolvimento do DM 2 (JENSEN *et al.*, 2007).

Estudos epidemiológicos revelaram forte associação entre o baixo peso ao nascer e o risco aumentado de desenvolver DM 2 (OZANNE e HALES, 2002). Em estudo de revisão Somm *et al.* (2009) demonstrou uma tendência a maior glicemia e um aumento da prevalência de diabetes em crianças nascidas de mulheres tabagistas. Ainda, segundo Ravelli *et al.* (1998), a má nutrição durante o período fetal humano pode levar a mudanças permanentes no metabolismo da glicose-insulina, mesmo que o efeito sobre o crescimento fetal seja pequeno, como achado no presente estudo.

A aparente RCIU observada no nosso modelo de exposição ao tabaco não alterou o perfil lipídico dos animais. O mesmo padrão de resultado foi obtido por Gomes e Seraphim (2010) (GOMES e SERAPHIM, 2010). Em humanos, a RCIU parece não estar associada

com o perfil lipídico (LEVITT *et al.*, 2000; OWEN *et al.*, 2003; HUXLEY *et al.*, 2004; RESTREPO *et al.*, 2009). No entanto, essa associação tem sido observada com o tabagismo materno, tanto em animais (NG *et al.*, 2009) como em humanos (JADDOE *et al.*, 2008), embora a exposição passiva por si talvez não seja capaz de produzir tal desfecho. A exposição passiva também não alterou a adiposidade dos animais, a qual poderia influenciar o perfil lipídico. Outra hipótese para o perfil lipídico normal observado no nosso estudo pode estar relacionada à idade dos animais. Os níveis de LDL plasmáticos são determinados por um balanço entre sua síntese e eliminação. Tanto em humanos como em ratos a remoção plasmática das partículas de LDL é reduzida com o envelhecimento, provavelmente como consequência da redução dos receptores hepáticos de LDL, acompanhada pela diminuição na decomposição do colesterol junto a ácidos biliares (RESTREPO *et al.*, 2009). No nosso estudo os animais foram acompanhados por aproximadamente 80 dias, idade em que são considerados adultos jovens e, possivelmente, com seu metabolismo preservado.

Em animais existe a relação entre exposição à nicotina na gestação e resposta alterada ao estresse na vida adulta (POLAND *et al.*, 1994). Jones *et al.* (2006), sugere que processos que ocorrem durante a vida fetal, resultando em recém-nascidos menores, tem um efeito duradouro sobre a resposta adrenocortical ao estresse em meninos e na atividade adrenocortical basal em meninas. Contudo, em resultados preliminares observados no presente estudo não foi verificada diferença na área sob a curva de corticosterona. Esses resultados não são conclusivos em função do tamanho da amostra.

O modelo animal utilizado neste trabalho apresentou algumas limitações. Uma delas foi a incapacidade de verificar a duração da gestação com precisão, visto que não é possível determinar o exato momento da fertilização. Assim, cada rata pode ter tido algumas horas de diferença na duração da gestação, o que pode ser importante em animais de metabolismo rápido. Além disso, não foi verificado o ciclo estral das fêmeas antes da coleta de material.

Essa decisão deve-se ao fato do método ao qual as ratas seriam submetidas para verificar o ciclo ser considerado como um fator estressor.

Por outro lado, o delineamento dos grupos é um ponto positivo do nosso trabalho, visto que o controle do estresse da manipulação a que os animais eram expostos não foi realizado em outros estudos de restrição de crescimento e/ou exposição ao tabaco. A utilização de biomarcadores para as diferentes fases do cigarro comprovando a exposição dos animais ao fumo também foi um aspecto importante pouco relatado na literatura.

## 9 CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou que o modelo utilizado foi efetivo ao expor ratas prenhes ao tabaco, verificado pelas análises de biomarcadores de exposição, a cotinina e a carboxihemoglobina. Apesar da exposição ao tabaco, sob as presentes condições, ser relativamente pequena, resultou em menor ganho de peso do grupo exposto ao tabaco durante a prenhez, assim como menor peso ao nascer, acompanhado de hipoglicemia e menores valores de insulina. Estes desfechos caracterizam a RCIU.

A exposição ao tabaco durante o período fetal foi capaz de programar o funcionamento do metabolismo de forma persistente, o que está relacionado à resistência à insulina na vida adulta.

O modelo animal proposto mostra-se útil na investigação de outros desfechos e mecanismos relacionados à exposição ao tabagismo durante a gestação.

## 10. PERSPECTIVAS

Muitos aspectos da função placentária são críticos para o crescimento e desenvolvimento fetal, incluindo o transporte de nutrientes como a glicose e aminoácidos da mãe para o feto (MURPHY *et al.*, 2006). Estudos na literatura investigaram a placenta e sua relação com o tabagismo em relação a alterações histopatológicas, diminuição do volume de capilares e aumento da apoptose (PAGE *et al.*, 2002; CARMINES *et al.*, 2003; ISAKSEN *et al.*, 2004).

O presente modelo abre um vasto campo para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos ao baixo peso ao nascer, o papel da placenta e a influência do tabaco. O transportador de glicose tipo 1 é abundante na placenta. A hipoglicemia, constatada nos filhotes nascidos por cesariana, pode estar relacionada com reduzido fornecimento e transferência de glicose através da placenta (MURPHY *et al.*, 2006). Dentre as perspectivas está a avaliação do efeito da exposição ao tabaco intra-útero sobre a expressão do transportador de glicose (GLUT-1) na placenta.

Além disso, baseando-se nos resultados encontrados em relação ao TTG e ao crescimento dos animais expostos ao tabaco e no fato do tipo de alimentação poder interferir na predisposição ao desenvolvimento de doenças (BISMARCK-NASR *et al.*, 2008), torna-se interessante submeter os animais durante a puberdade a uma dieta palatável e hipercalórica, semelhante ao atual padrão ocidental. Dessa forma, verificar se este desafio metabólico induziria maior adiposidade abdominal e/ou maior ganho de peso e investigar a programação fetal associada a fatores ambientais.

A partir dos resultados das análises dos testes de corticosterona e o do perfil lipídico, torna-se importante ampliar o tamanho das amostras, com o objetivo de melhor compreender o impacto da exposição ao tabaco e seus desfechos na vida adulta.

**REFERÊNCIAS**

1. ALEIXO NETO, ANTONIO. Efeitos do fumo na gravidez. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, p. 420-424, 1990.
2. AMORIM, LEILIANE COELHO ANDRÉ. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 158-170, 2003.
3. ARAÚJO, ALBERTO JOSÉ DE et al. Diretrizes para Cessação do Tabagismo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, p. S1-S76, 2004.
4. BARKER, D J; OSMOND, C; LAW, C M. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 43, n. 3, p. 237-240, September 1, 1989.
5. BARKER, D. J. P. In utero programming of chronic disease. **Clinical Science**, v. 95, n. 2, p. 115-128, Aug 1998.
6. \_\_\_\_\_. The developmental origins of adult disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 588S-595S, Dec 2004.
7. BARKER, D. J. P. et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. **International Journal of Epidemiology**, v. 31, n. 6, p. 1235-1239, Dec 2002.
8. BARRADAS, L. Involuntary exposure to tobacco smoke in children. Smoking in young people. **Revista Portuguesa Pneumologia**, v. 17, n. 1, p. 3-4, Jan-Feb 2011.
9. BASSI, J. A. et al. Fetal growth retardation due to maternal tobacco smoke exposure in the rat. **Pediatric Research**, v. 18, p. 127-130, 1984.
10. BELKACEMI, LOUIZA et al. Maternal Undernutrition Influences Placental-Fetal Development. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 3, p. 325-331, September 1, 2010.
11. BENOWITZ, N. L. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. **Epidemiologic Reviews**, v. 18, n. 2, p. 188-204, 1996.
12. \_\_\_\_\_. Biomarkers of environmental tobacco smoke exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. Suppl 2, 1999.
13. BERGANT, A. M. et al. Childbirth as a Biological Model for Stress? **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 45, n. 3, p. 181-185, 1998.
14. BERGEN, H. T. Exposure to smoke during development: fetal programming of adult disease. **Tobacco Induced Diseases**, v. 3, n. 2, p. 5-16, 2006.
15. BERNSTEIN, I. M. et al. Impact of maternal cigarette smoking on fetal growth and body composition. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 183, n. 4, p. 883-886, Oct 2000.

16. BEST, DANA. Technical Report—Secondhand and Prenatal Tobacco Smoke Exposure. **Pediatrics**, p. 200921201, October 19, 2009.
17. BILLAUD, N.; LEMARIE, P. Deleterious effects of maternal smoking during pregnancy on the fetus and child. **Archives De Pediatrie**, v. 8, n. 8, p. 875-881, Aug 2001.
18. BISMARCK-NASR, ELIZABETH MARIA; FRUTUOSO, MARIA FERNANDA PETROLI; GAMABARDELLA, ANA MARIA DIANEZI. Efeitos tardios do baixo peso ao nascer. **Revista brasileira de crescimento e desenvolvimento humano**, v. 18, p. 98-103, 2008.
19. BLAKE, K. V. et al. Maternal cigarette smoking during pregnancy, low birth weight and subsequent blood pressure in early childhood. **Early Human Development**, v. 57, n. 2, p. 137-147, Feb 2000.
20. BRANDINI, DANIELA ATILI et al. Effects of cigarette smoke on the Meckel's cartilage of rat fetus: morphologic, morphometric and stereologic study. **Brazilian Dental Journal**, v. 16, p. 62-66, 2005.
21. BRASIL. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios: Um Panorama da Saúde no Brasil - Acesso e utilização dos serviços, condições de saúde e fatores de risco e proteção à saúde 2008**. MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO. DIRETORIA DE PESQUISAS. COORDENAÇÃO DE TRABALHO E RENDIMENTO. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2010.
22. BYRNE, C D; PHILLIPS, D I. Fetal origins of adult disease: epidemiology and mechanisms. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, n. 11, p. 822-828, November 1, 2000.
23. CARMINES, E. L. et al. In utero exposure to 1R4F reference cigarette smoke: Evaluation of developmental toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 75, n. 1, p. 134-147, 2003.
24. CARMINES, EDWARD L.; RAJENDRAN, NARAYANAN. Evidence for Carbon Monoxide as the Major Factor Contributing to Lower Fetal Weights in Rats Exposed to Cigarette Smoke. **Toxicological Sciences**, v. 102, n. 2, p. 383-391, April 1, 2008.
25. CHAOUACHI, KAMAL. Hookah (Shisha, Narghile) Smoking and Environmental Tobacco Smoke (ETS). A Critical Review of the Relevant Literature and the Public Health Consequences. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, n. 2, p. 798-843, 2009.
26. CHARMANDARI, EVANGELIA; TSIGOS, CONSTANTINE; CHROUSOS, GEORGE. ENDOCRINOLOGY OF THE STRESS RESPONSE<sup>1</sup>. **Annual Review of Physiology**, v. 67, n. 1, p. 259-284, 2005.
27. COGGINS, CHRISTOPHER R.E. Review Article: A Review of Chronic Inhalation Studies with Mainstream Cigarette Smoke, in Hamsters, Dogs, and Nonhuman Primates. **Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 5, p. 550-557, August 1, 2001.



28. COMMITTEE ON SECONDHAND SMOKE EXPOSURE; ACUTE CORONARY EVENTS; INSTITUTE OF MEDICINE. **Secondhand Smoke Exposure and Cardiovascular Effects: Making Sense of the Evidence**. The National Academies Press, 2010.
29. CUTLER, A. R. et al. Prenatal cocaine and/or nicotine exposure in rats: Preliminary findings on long-term cognitive outcome and genital development at birth. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 18, n. 6, p. 635-643, Nov-Dec 1996.
30. DA S BENETTI, CARLA et al. Could Preference for Palatable Foods in Neonatally Handled Rats Alter Metabolic Patterns in Adult Life? **Pediatric Research**, v. 62, n. 4, p. 405-411, 2007.
31. DAVIES AA, smith GD, Ben-Shlomo Y, Litchfield P. Low birth weight is associated with higher adult total cholesterol concentration in men: findings from an occupational cohort of 25,843 employees. **Circulation** v. 110, p. 1258-62, 2004.
32. DIDERHOLM, B. Perinatal energy metabolism with reference to IUGR & SGA: studies in pregnant women & newborn infants. **Indian Journal of Medical Research**, v. 130, p. 612-617, 2009.
33. ESPOSITO, E. R. et al. An animal model of cigarette smoke-induced in utero growth retardation. **Toxicology**, v. 246, n. 2-3, p. 193-202, 2008.
34. FARKAS, S. et al. Prenatal cigarette smoke exposure: Pregnancy outcome and gestational changes in plasma nicotine concentration, hematocrit, and carboxyhemoglobin in a newly standardized rat model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 214, n. 2, p. 118-125, Jul 2006.
35. FOWDEN, A. L. et al. Programming placental nutrient transport capacity. **The Journal of Physiology**, v. 572, n. 1, p. 5-15, April 1, 2006.
36. FOWDEN, ABIGAIL L.; GIUSSANI, DINO A.; FORHEAD, ALISON J. Endocrine and metabolic programming during intrauterine development. **Early Human Development**, v. 81, n. 9, p. 723-734, 2005.
37. GAWORSKI, C. L. et al. In utero and lactation exposure of rats to 1R4F reference cigarette mainstream smoke: Effect on prenatal and postnatal development. **Toxicological Sciences**, v. 79, n. 1, p. 157-169, 2004.
38. GOMES, PATRÍCIA RODRIGUES LOURENÇO; SERAPHIM, PATRICIA MONTEIRO. Efeito da exposição à fumaça de cigarro durante a prenhez e a lactação de ratas e sua prole sobre parâmetros séricos e morfométricos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, p. 591-596, 2010.
39. GONÇALVES-SILVA, R.M.V; ; LEMOS-SANTOS, M.G.F; ; BOTELHO, C;. Influência do tabagismo no ganho ponderal, crescimento corporal, consumo alimentar e hídrico de ratos. **Jornal de Pneumologia**, v. 23, n. 3, p. 124-130, 1997.

40. GUILLET, R.; MICHAELSON, S. M. CORTICOTROPIN RESPONSIVENESS IN NEONATAL RAT. **Neuroendocrinology**, v. 27, n. 3-4, p. 119-125, 1978.
41. HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. TYPE-2 (ON-INSULIN-DEPENDENT) DIABETES-MELLITUS - THE THRIFTY PHENOTYPE HYPOTHESIS. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595-601, Jul 1992.
42. HATSUKAMI, D. K. et al. Biomarkers of tobacco exposure or harm: Application to clinical and epidemiological studies. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 5, n. 3, p. 387-396, January 1, 2003.
43. HAY, W. W., JR. Placental-fetal glucose exchange and fetal glucose metabolism. **Transactions of the American Clinical Climatological Association**, v. 117, p. 321-339; discussion 339-340, 2006.
44. HENNING, S. J. PLASMA CONCENTRATIONS OF TOTAL AND FREE CORTICOSTERONE DURING DEVELOPMENT IN RAT. **American Journal of Physiology**, v. 235, n. 5, p. E451-E456, 1978.
45. HENRIKSEN, T. Foetal nutrition, foetal growth restriction and health later in life. **Acta Pædiatrica**, v. 88, p. 4-8, 1999.
46. HOLLOWAY, A. et al. 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**, v. 48, n. 12, p. 2661-2666, 2005.
47. HUXLEY, RACHEL et al. Birth Weight and Subsequent Cholesterol Levels Exploration of the "Fetal Origins" Hypothesis. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 292, n. 22, p. 2755-2764, 2004.
48. INO, T. et al. Relationship between body mass index of offspring and maternal smoking during pregnancy. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 4, p. 554-558, 2012.
49. INO, TOSHIHIRO. Maternal smoking during pregnancy and offspring obesity: Meta-analysis. **Pediatrics International**, v. 52, n. 1, p. 94-99, 2010.
50. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Tabagismo Passivo. <http://www.inca.gov.br/tabagismo/frameset.asp?item=passivo&link=tabagismo.htm> 2012. Acesso em: 01/03/2012.
51. ISAKSEN, CHRISTINA VOGT et al. Maternal Smoking, Intrauterine Growth Restriction, and Placental Apoptosis. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 7, n. 5, p. 433-442, 2004.
52. JADDOE, V. W. et al. Maternal smoking in pregnancy is associated with cholesterol development in the offspring: A 27-years follow-up study. **Atherosclerosis**, v. 196, n. 1, p. 42-48, Jan 2008.

53. JARDIM, JOSÉ ROBERTO et al. An Inhalation Chamber Model for Controlled Studies of Tobacco Smoke Toxicity in Rodents. **Archivos de Bronconeumología**, v. 46, n. 9, p. 455-458, 2010.
54. JENSEN, CHRISTINE B. et al. Altered Skeletal Muscle Fiber Composition and Size Precede Whole-Body Insulin Resistance in Young Men with Low Birth Weight. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 4, p. 1530-1534, April 1, 2007.
55. JONES, A. et al. Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 5, p. 1868-1871, May 2006.
56. KUCZKOWSKI, KRZYSZTOF M. Tabagismo durante a gravidez: um problema maior do que se imagina. **Jornal De Pediatria**, v. 80, p. 83-84, 2004.
57. KUHN, C. M.; PAUK, J.; SCHANBERG, S. M. ENDOCRINE RESPONSES TO MOTHER-INFANT SEPARATION IN DEVELOPING RATS. **Developmental Psychobiology**, v. 23, n. 5, p. 395-410, Jul 1990.
58. KYROU, IOANNIS; TSIGOS, CONSTANTINE. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 6, p. 787-793, 2009.
59. LAITINEN, J. et al. Predictors of abdominal obesity among 31-y-old men and women born in Northern Finland in 1966. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, p. 180-90, 2004.
60. LANGLEY-EVANS, SIMON C. Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. **Journal of Anatomy**, v. 215, n. 1, p. 36-51, 2009.
61. LEON, DAVID A.; JOHANSSON, MALIN; RASMUSSEN, FINN. Gestational Age and Growth Rate of Fetal Mass Are Inversely Associated with Systolic Blood Pressure in Young Adults: An Epidemiologic Study of 165,136 Swedish Men Aged 18 Years. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, n. 7, p. 597-604, October 1, 2000.
62. LEOPÉRCIO, WALDIR; GIGLIOTTI, ANALICE. Tabagismo e suas peculiaridades durante a gestação: uma revisão crítica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, p. 176-185, 2004.
63. LEVITT, N. S. et al. Impaired glucose tolerance and elevated blood pressure in low birth weight, nonobese, young south african adults: early programming of cortisol axis. **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 85, n. 12, p. 4611-4618, Dec 2000.
64. LUKE, B; HAWKINS, M M; PETRIE, R H. Influence of smoking, weight gain, and pregravid weight for height on intrauterine growth. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34, n. 7, p. 1410-1417, July 1, 1981.
65. MADI, JOSÉ MAURO; ; COELHO, CELSO P; ; LUNARDI, PAULO V. O uso do fumo durante o ciclo gravídico. Considerações fisiopatológicas e correlação preliminar com população de 1.559 pacientes. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 46, n. 2, p. 42-45, 1984.

66. MARTIN-GRONERT, M. S.; OZANNE, S. E. Experimental IUGR and later diabetes. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 5, p. 437-452, 2007.
67. MCDONALD, S. D. et al. The effect of tobacco exposure on the fetal hypothalamic–pituitary–adrenal axis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 113, n. 11, p. 1289-1295, 2006.
68. MCMULLEN, SARAH; MOSTYN, ALISON. Animal models for the study of the developmental origins of health and disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 68, n. 03, p. 306-320, 2009.
69. MELLO, P. R. B.; OKAY, T. S.; BOTELHO, C. The effects of exposing rats to cigarette smoke on milk production and growth of offspring. **Jornal De Pediatria**, v. 83, n. 3, p. 267-273, May-Jun 2007.
70. MELLO, PAULO ROBERTO BEZERRA DE; OKAY, THELMA SUELY; BOTELHO, CLOVIS. Influência da exposição a 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. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, p. 143-150, 2006.
71. MELLO, PAULO ROBERTO BEZERRA DE; PINTO, GILBERTO RODRIGUES; BOTELHO, CLOVIS. Influência do tabagismo na fertilidade, gestação e lactação. **Jornal de Pediatria**, v. 77, p. 257-264, 2001.
72. MELLO, PAULO ROBERTO BEZERRA DE. et al. Avaliação de um sistema de exposição tabágica passiva em modelo experimental utilizando cotinina e carboxiemoglobina como marcadores de exposição. **Pulmão RJ.**, v. 14, n. 3, p. 228-236, Jul-Ago-Set 2005.
73. MOORE, V M et al. Placental weight, birth measurements, and blood pressure at age 8 years. **Archives of Disease in Childhood**, v. 74, n. 6, p. 538-541, June 1, 1996 1996.
74. MURPHY, VANESSA E. et al. Endocrine Regulation of Human Fetal Growth: The Role of the Mother, Placenta, and Fetus. **Endocrine Reviews**, v. 27, n. 2, p. 141-169, April 1, 2006.
75. NAEYE, RICHARD L. Do Placental Weights Have Clinical Significance? **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 42, n. 11, p. 678-680, 1987.
76. NG, SHEUNG. P. et al. Prenatal exposure to cigarette smoke induces diet- and sex-dependent dyslipidemia and weight gain in adult murine offspring. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 7, p. 1042-1048, Jul 2009.
77. NIETO-DIAZ, ANIBAL et al. Intrauterine growth retardation at term: association between anthropometric and endocrine parameters. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 75, n. 2, p. 127-131, 1996.
78. OWEN, C. G. et al. Birth weight and blood cholesterol level: a study in adolescents and systematic review. **Pediatrics**, v. 111, n. 5 Pt 1, p. 1081-1089, May 2003.

79. OZANNE, SUSAN E.; HALES, C. NICHOLAS. Early programming of glucose–insulin metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, n. 9, p. 368-373, 2002.
80. PAGE, K. R. et al. The effects of smoking on placental membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 206, n. 1-2, p. 243-252, Aug 2002.
81. PETERSEN, G. O. et al. Cotinine as a biomarker of tobacco exposure: Development of a HPLC method and comparison of matrices. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 516-21, 2010.
82. PHILLIPS, DAVID I. W.; JONES, ALEXANDER. Fetal programming of autonomic and HPA function: do people who were small babies have enhanced stress responses? **The Journal of Physiology**, v. 572, n. 1, p. 45-50, April 1, 2006.
83. PICONE, T. A. et al. Pregnancy outcome in North American women. II. Effects of diet, cigarette smoking, stress, and weight gain on placentas, and on neonatal physical and behavioral characteristics. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 36, n. 6, p. 1214-1224, December 1, 1982.
84. PINHEIRO, ANELISE RÍZZOLO DE OLIVEIRA; FREITAS, SÉRGIO FERNANDO TORRES DE; CORSO, ARLETE CATARINA TITTONI. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 523-533, 2004.
85. PINTO, GILBERTO RODRIGUES; BOTELHO, CLOVIS. Influência do Tabagismo no Sistema Vascular Materno-fetal: estudo com Dopplervelocimetria. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 22, p. 641-646, 2000.
86. POLAND, RUSSELL E. et al. Exposure to threshold doses of nicotine in utero: I. Neuroendocrine response to restraint stress in adult male offspring. **Life Sciences**, v. 55, n. 20, p. 1567-1575, 1994.
87. PRINGLE, P. J. et al. The influence of cigarette smoking on antenatal growth, birth size, and the insulin-like growth factor axis. **The Journal of the Clinical and Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 5, p. 2556-2562, May 2005.
88. QUIGLEY, M. E. et al. EFFECTS OF MATERNAL SMOKING ON CIRCULATING CATECHOLAMINE LEVELS AND FETAL HEART-RATES. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 133, n. 6, p. 685-690, 1979.
89. RAJINI, P. et al. DECREASED FETAL WEIGHTS IN RATS EXPOSED TO SIDESTREAM CIGARETTE-SMOKE. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 22, n. 3, p. 400-404, Apr 1994.
90. RAVELLI, A. C. J. et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. **The Lancet**, v. 351, n. 9097, p. 173-177, 1998.
91. RESTREPO, MARÍA CLARA; HORTA, BERNARDO LESSA; GIGANTE, DENISE PETRUCCI. Perfil lipídico na adolescência: efeito de exposições intrauterinas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p. 2345-2353, 2009.

92. RODRIGUEZ-MORAN, M. et al. Placental immaturity and hyperinsulinaemia in full-term newborns. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 37, n. 7, p. 529-534, Jul 2007.
93. ROGERS, J. M. Tobacco and pregnancy. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 152-160, 2009.
94. ROKICKI, W. et al. Free cortisol of human plasma in the first three months of life. **Biology of the neonate**, v. 57, n. 1, p. 21-29, 1990.
95. ROSS, MICHAEL G.; BEALL, MARIE H. Adult Sequelae of Intrauterine Growth Restriction. **Seminars in Perinatology**, v. 32, n. 3, p. 213-218, 2008.
96. RUDATSIKIRA, E. M. et al. Exposure to environmental tobacco smoke in the nonsmoking population of Cambodia. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 34, n. 1, p. 69-73, Jan 2008.
97. SAPOLSKY, R. M.; MEANEY, M. J. Maturation of the adrenocortical stress response - neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain Research Reviews**, v. 11, n. 1, p. 65-76, Mar 1986.
98. SCHERER, G.; RICHTER, E. Biomonitoring exposure to environmental tobacco smoke (ETS): A critical reappraisal. **Human & Experimental Toxicology**, v. 16, n. 8, p. 449-459, Aug 1997.
99. SCHICK, S; GLANTZ, S. Philip Morris toxicological experiments with fresh sidestream smoke: more toxic than mainstream smoke. **Tobacco Control**, v. 14, n. 6, p. 396-404, December 1, 2005.
100. SCHLUMPF, M. et al. A NEW DEVICE FOR MONITORING EARLY MOTOR DEVELOPMENT - PRENATAL NICOTINE-INDUCED CHANGES. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 30, n. 1, p. 199-203, May 1988.
101. SELLER, MARY J.; BNAIT, KULWINDER S. Effects of tobacco smoke inhalation on the developing mouse embryo and fetus. **Reproductive Toxicology**, v. 9, n. 5, p. 449-459, 1995.
102. SHAHKHALILI, YASAMAN et al. Comparison of two models of intrauterine growth restriction for early catch-up growth and later development of glucose intolerance and obesity in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 1, p. 141-146, January 1, 2010.
103. SHANKARAN, SEETHA et al. Association Between Patterns of Maternal Substance Use and Infant Birth Weight, Length, and Head Circumference. **Pediatrics**, v. 114, n. 2, p. e226-e234, August 1, 2004.
104. SILVEIRA, P. P. et al. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 111-118, 2010.

105. SILVEIRA, PATRÍCIA P. et al. Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD). **Jornal De Pediatria**, v. 83, p. 494-504, 2007.
106. SIMMONS, REBECCA A.; TEMPLETON, LORI J.; GERTZ, SHIRA J. Intrauterine Growth Retardation Leads to the Development of Type 2 Diabetes in the Rat. **Diabetes**, v. 50, n. 10, p. 2279-2286, October 1, 2001.
107. SLOTKIN, T. A. Fetal nicotine or cocaine exposure: Which one is worse? **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 285, n. 3, p. 931-945, Jun 1998.
108. SMALL, ELYSIA et al. Tobacco smoke exposure induces nicotine dependence in rats. **Psychopharmacology**, v. 208, n. 1, p. 143-158, 2010.
109. SMITH, CARR J.; FISCHER, THOMAS H. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v. 158, n. 2, p. 257-267, 2001.
110. SOLDIN, O. P. et al. Thyroid hormone levels associated with active and passive cigarette smoking. **Thyroid**, v. 19, n. 8, p. 817-823, Aug 2009.
111. SOMM, EMMANUEL et al. Prenatal nicotine exposure and the programming of metabolic and cardiovascular disorders. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 304, n. 1-2, p. 69-77, 2009.
112. STRAUSS, RICHARD S.; DIETZ, WILLIAM H. Low Maternal Weight Gain in the Second or Third Trimester Increases the Risk for Intrauterine Growth Retardation. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 5, p. 988-993, May 1, 1999.
113. SZETO, IGNATIUS M. Y. et al. High multivitamin intake by Wistar rats during pregnancy results in increased food intake and components of the metabolic syndrome in male offspring. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 2, p. R575-R582, August 2008.
114. TANNENBAUM, B. et al. Dynamic variations in plasma corticosteroid-binding globulin and basal HPA activity following acute stress in adult rats. **J Neuroendocrinol**, v. 9, n. 3, p. 163-168, Mar 1997.
115. THORN, STEPHANIE R. et al. The Intrauterine Growth Restriction Phenotype: Fetal Adaptations and Potential Implications for Later Life Insulin Resistance and Diabetes. **Seminars Reproductive Medicine**, v. 29, n. 03, p. 225,236, 27.06.2011.
116. TZIOMALOS, KONSTANTINOS; CHARSOULIS, FAIDON. Endocrine effects of tobacco smoking. **Clinical Endocrinology**, v. 61, n. 6, p. 664-674, 2004.
117. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General**. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Centers For Disease Control And Prevention, Coordinating Center For Health Promotion, National Center For

Chronic Disease Prevention And Health E Promotion, Office On Smoking And Health. Atlanta 2006.

118. UNGER, JENNIFER B. et al. Exploring the cultural context of tobacco use: A transdisciplinary framework. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 5, n. Suppl 1, p. S101-S117, December 1, 2003.

119. US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **The health consequences of smoking: a report of the Surgeon General**. US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES: Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2004.

120. VARDAVAS, CONSTANTINE et al. Smoking and smoking cessation during early pregnancy and its effect on adverse pregnancy outcomes and fetal growth. **European Journal of Pediatrics**, v. 169, n. 6, p. 741-748, 2010.

121. VIELWERTH, S. E. et al. The impact of maternal smoking on fetal and infant growth. **Early Hum Dev**, v. 83, n. 8, p. 491-495, Aug 2007.

122. VUGUIN, P. M. Animal Models for Small for Gestational Age and Fetal Programming of Adult Disease. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 68, n. 3, p. 113-123, 2007.

123. WANDERLEY, EMANUELA NOGUEIRA; FERREIRA, VANESSA ALVES. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 185-194, 2010.

124. WARD, CORINNE; LEWIS, SARAH; COLEMAN, TIM. Prevalence of maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure during pregnancy and impact on birth weight: retrospective study using Millennium Cohort. **BMC Public Health**, v. 7, n. 1, p. 81, 2007.

125. WICKSTROM, R. Effects of Nicotine During Pregnancy: Human and Experimental Evidence. **Current Neuropharmacology**, v. 5, n. 3, p. 213-222, 2007.

126. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases**. Geneva: World Health Organization 2010.

127. \_\_\_\_\_. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Tobacco Smoking**. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Geneva: World Health Organization. Volume 38. 1986.

128. \_\_\_\_\_. **Environmental Health Criteria 213: Carbon Monoxide (Second Edition)** INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHEMICALS. Geneva: World Health Organization 2003.

129. \_\_\_\_\_. **WHO Report on the global tobacco epidemic, 2009 - Implementing smoke-free environments**. Geneva: World Health Organization 2009.



130. YOSHIMURA, S. et al. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. **Steroids**, v. 68, n. 5, p. 439-445, May 2003.

131. ZHANG, LINJIE et al. Tabagismo materno durante a gestação e medidas antropométricas do recém-nascido: um estudo de base populacional no extremo sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, p. 1768-1776, 2011.

**ANEXO****ANEXO A - ARTIGO: ESTABLISHING AN ANIMAL MODEL OF PASSIVE EXPOSURE TO TOBACCO SMOKE DURING PREGNANCY: METABOLIC OUTCOMES ON FETAL DEVELOPMENT**

Artigo submetido à publicação na Revista Pharmacol Biochem Behav

**Establishing an animal model of passive exposure to tobacco smoke during pregnancy: metabolic outcomes on fetal development**

Mariana D. Schiffner<sup>a</sup>, Isabel C. R. Werlang<sup>a</sup>, Patricia P. Silveira<sup>a</sup>, Carla Dalmaz<sup>b</sup>, Carmem Pilla<sup>c</sup>, Marcelo Z. Goldani<sup>a</sup>, Fernanda U. Fontella<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica da UFRGS

<sup>c</sup> Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Corresponding author: Fernanda Urruth Fontella

E-mail adress: [furruth@gmail.com](mailto:furruth@gmail.com)

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Largo Eduardo Z. Faraco

Porto Alegre-RS 90035-903

Centro de Pesquisa Experimental, 1º andar – Laboratório de Pediatria Translacional

tel.: +55(51)3359-8019; fax: +55(51)3359-8515

**ABSTRACT**

Tobacco smoke exposure *in utero* results in a variety of adverse developmental outcomes such as intrauterine growth restriction and low birth weight. This study aimed at investigating the effects of prenatal exposure to tobacco smoke on the fetal growth and in

biochemical parameters of a passive exposure in an animal model. The exposure to tobacco smoke induced an increase in carboxyhemoglobin levels immediately at the end of the exposure and an increase in serum cotinine levels after 21 days of exposure. Passive exposure to tobacco during the intrauterine period significantly decreased the birth weight of pups. Moreover, pups exposed to tobacco smoke had significantly lower serum glucose and insulin. These biochemical results, adding to the low birth weight, demonstrate that exposure to tobacco, under the current conditions, produced a small but significant intrauterine growth restriction.

Key words: Tobacco Smoke, Intrauterine Growth Restriction, Cotinine and Carboxyhemoglobin

## 1. Introduction

Passive exposure of pregnant women to tobacco smoke can cause low birth weight and preterm delivery, intrauterine growth restriction, delayed lung development, and increased frequency of miscarriages (Barradas, 2011, World Health Organization, 2009). Considering that, fetal smoke exposure might be involved in the mechanisms underlying the associations between low birth weight and the development of cardiovascular disease, obesity and type 2 diabetes later in life (Bakker and Jaddoe, 2011).

The biochemical and molecular mechanisms possibly involved in these outcomes have not been fully elucidated. The use of a suitable animal model would allow a factible assessment for obtaining biological material in a brief period of time making possible a satisfactory control of confounding factors. Among the animal models used, we can highlight the oral administration of nicotine, instead of cigarette smoke (Slotkin, 1998, Wickstrom, 2007), and passive exposure to cigarette smoke (Carmines and Rajendran, 2008, Esposito *et al.*, 2008, Farkas *et al.*, 2006, Mello *et al.*, 2005b). The first one has the advantage of assessing the effects of a specific metabolite and is easy to perform. However, the oral absorption of nicotine undergoes extensive first pass metabolism, thus the absorption differs from what occurs with smokers and passive exposure to tobacco by nonsmokers (Benowitz, 1996). Furthermore, a continuous infusion of nicotine does not simulate the peaks observed in smokers. Moreover, the animal model of passive exposure to

tobacco allows a more comprehensive study involving all other tobacco metabolites known to be adverse to health (O'Dell and Khroyan, 2009, Wickstrom, 2007). However, in studies using animal models frequently the brand of cigarettes is not described or the studies do not use the cigarettes commonly available to the population, the way of production of smoke and/or do not use a biomarker for evaluating exposure to tobacco.

In the current study, we used Wistar rats to establish an animal model of tobacco exposure in the prenatal period in order to investigate the effects of this exposure on fetal biometry and biochemical parameters in the offspring.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Animals**

Animal care and use were in accordance with the International Council for Laboratory Animal Science and the Brazilian Law on Animal Experimentation number 11.794/2008. All procedures were approved by the Ethics Committee of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*.

Virgin Wistar female rats (body weight between 200 and 300 g) were obtained from *Universidade Federal de Pelotas*, (Brazil) and *Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde* (Porto Alegre, Brazil). The experimentally naive animals were randomized and acclimated in the Animal Facility of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA) for two weeks. They were housed in groups of four to five in home cages made of Plexiglas material (41 x 34 x 16 cm) with the floor covered with sawdust and maintained in a standard environment: 12-hour light/dark cycle (lights on between 7 AM and 7 PM), room temperature of  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 70% humidity, cage cleaning once a week, with standard chow and water *ad libitum*, except during tobacco exposure procedures.

## 2.2. Procedure to tobacco exposure smoke

Tobacco exposure was based on Mello and Co-author's Model (2005). The apparatus for tobacco exposure was made by Engineering Department from *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* and consisted of two wooden boxes, measuring 94 x 39.5 x 38.5 cm, divided into two chambers: combustion and exposure compartments (Figure 1). In the combustion compartment there was support made of metal where cigarettes were inserted to proceed the burning; and the passive exposure happened in the exposure compartment, where the animals were kept inside a cage similar to the home cages. The compartments were separated by a partition slotted (partition permeable to the passage of smoke), with an exhaustion system of smoke in the upper part of the exposure compartment, at the point farthest from the combustion. This provision guaranteed that the smoke generated by cigarettes was dragged into the environment where the animals were. A pipe led the room air from the exposure compartment to the outside of the building.

Three female rats were placed inside the cage in the exposure compartment for the tobacco exposure procedure. A cigarette (Malboro red pack ®, Phillip Morris) was lit and placed in the central space of the support. The burning lasted about 15 minutes. The exhaustion system was switched on for 10 seconds every 5 minutes. After total burning, the exhaustion system remained working for 15 min to complete removal of the smoke.

## 2.3. Experiment I – Acute exposure to tobacco smoke

Twelve female rats were randomized in two groups: tobacco exposure (n=6) and manipulated control (n=6). The rats from the group exposed to tobacco were exposed only once. Then, they were decapitated and the trunk blood was collected and immediately analyzed to verify HbCO by gasometry. HbCO was used as a marker of acute exposure to tobacco. Blood HbCO measurements were performed to demonstrate that smoke was

inhaled into the lungs. Since HbCO has a half-life of about 42 min in the rat, it was used only in the acute study (Carmines *et al.*, 2003, Carmines and Rajendran, 2008). Manipulated control rats were submitted to the same procedure in an identical tobacco box, differing simply by the absence of exposure to the cigarette smoke.

#### 2.4. Experiment II - Repeated exposure to tobacco smoke during pregnancy

Thirty-one nullipara naive female rats were subjected to daily control of the estrous cycle by analysis of vaginal smears. Animals were mated overnight. The next morning, vaginal smears were examined and the presence of sperm was taken to indicate the gestation day zero (GD 0). The animals were randomly assigned to three groups: 10 tobacco exposure, 10 manipulated control, and 11 controls.

The tobacco exposure group was exposed twice a day (7:30 AM and 5:00 PM) throughout gestation (GDs 1-21). The control group was left undisturbed in the home cage, being handled weekly only for weighing. All groups of pregnant rats had their food intake measured (GD 3, GD 10 and GD 17) and were weighed weekly during the gestational period (GD 1, GD 7, GD 14 and GD 21).

#### 2.5. Cesarean section and collection of biological material.

On GD 22, the female pregnant rats were decapitated, the trunk blood was collected and the serum was separated and frozen at -80°C for further analysis. Immediately after, the caesarean section was initiated. The pups and their placentas were weighed (scale Marte® model AC 5.500 with a precision of 0,01g), the pups length were measured (from the snout to the anus) and immediately decapitated. The serum was separated, frozen and stored at -80 °C until the day for analysis.

The female rats that had pups dead and/or malformed at birth (1 rat from control group and 2 rats from tobacco exposure group) were excluded due to the difficulty of measuring the weight of the litter.

## 2.6. Biochemical measurements

Serum cotinine of progenitors was evaluated in the Clinical Analysis Laboratory of HCPA by High-Performance Liquid Chromatography (Petersen *et al.*, 2010). Serum maternal glucose was also analyzed in the Clinical Analysis Laboratory of HCPA by enzymatic colorimetric. Serum Glucose and insulin levels of the pups were analyzed by Glucose HK *Liquiform* kit (Labtest)<sup>®</sup> and Rat/mouse Insulin Elisa Kit (Millipore, Missouri, USA)<sup>®</sup> respectively, according to manufacturer's instructions.

## 2.7. Statistical analysis

To determine differences in weight gain during pregnancy, birth weight, birth length, placental size, serum glucose and insulin levels, Generalized Estimating Equations (GEE) were performed; for carboxyhemoglobin, Student t-test was used; for glycemia, one-way ANOVA; to determine differences among food intake during pregnancy repeated-measures analysis of variance (ANOVA) were utilized. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

# 3. RESULTS

## 3.1. Experiment I

Acute exposure to tobacco smoke resulted in increased levels of carboxyhemoglobin, as demonstrated by t-test analysis (Fig. 2).

## 3.2. Experiment II

Female rats exposed to tobacco smoke throughout pregnancy showed increased cotinine levels (42.52 ng/mL, while the control and manipulated control groups showed no detectable values) (Table 1). The limit of detection was 10 ng/mL, so the limit of sensitivity

was used to express the parameter values related to the control and manipulated control groups.

Figure 3 shows the pattern of weight gain of the three groups throughout gestation. GEE adjusted by the number of pups/litter, showed a significant difference in the weight gain between tobacco exposure group and the others groups (Bonferroni,  $P < 0.0001$ ). However, food intake was not affected by exposure to tobacco throughout the gestation (Table 2).

Serum glucose level of progenitors did not differ between groups, as shown in Table 3.

Pups passively exposed to tobacco during the intrauterine period showed a significant decrease in birth weight compared with those nonexposed groups, as displayed in Fig. 4.

Regarding pups birth length, placental weight and percentage of the placenta/birth weight of the pups, the GEE analysis showed no effect between the groups, as shown in Table 4.

Passive exposure to tobacco smoke in the intrauterine period decreased significantly serum glucose levels of pups compared with control group; the manipulated control group was not different from the other two, as analyzed by GEE (Figure 5).

Pups exposed to passive tobacco smoke during intra-uterine period had insulin levels significantly lower than other groups, as shown in Figure 6.

#### **4. DISCUSSION**

The proposed experimental model of exposure to tobacco smoke during pregnancy was successful in inducing high levels of carboxyhemoglobin and cotinine in the animals



exposed to tobacco smoke, and, in pups, lower birth weight, as well as hypoglycemia and hypoinsulinemia, widely described in association with IUGR.

Several methods of tobacco smoke exposure are described in the literature and they vary widely. However, some proposed models have limitations, for example, most animal models have employed nicotine as a substitute for tobacco smoke, not considering the other constituents of tobacco (Slotkin, 1998, Wickstrom, 2007). Another model is the exposure to smoke from a reference cigarette produced by Kentucky University (Carmines *et al.*, 2003, Farkas *et al.*, 2006, Rajini *et al.*, 1994), whose constitution does not contain 600 potential harmful additives included in commercially available cigarettes, nor are they commonly smoked by the population (Esposito *et al.*, 2008).

The method chosen for this study was a passive exposure, where the animal is exposed to sidestream cigarette smoke (Gonçalves-Silva *et al.*, 1997, Mello *et al.*, 2005b). This method exposes the animals to all constituents present in tobacco, as well as inhalation at which the humans are submitted passively. Further, it is a type of low cost and easily reproduced.

This study used two biomarkers of tobacco smoke exposure: HbCO and cotinine. According to Scherer and Richter (1997), HbCO have been proven a useful biomarker for acute tobacco smoke exposure under well defined experimental conditions. In smokers, HbCO is a biomarker of the gaseous phase of tobacco and the amount of CO absorbed depends on the number of cigarettes smoked during the last hours and the duration of exposure (Mello *et al.*, 2005b).

The group exposed acutely to tobacco showed an increase of about 1.5% for HbCO compared to manipulated control group. According to WHO (2003), in nonsmokers the HbCO is between 0.5% to 2% and acute exposure to environmental tobacco smoke has been reported to increase HbCO levels in about 1%, as seen in this study.

Importantly, the amount of HbCO is a simple measure of exposure to CO over the last 24 hours and it is not cumulative, because the HbCO half-life in human of is about 4-6h, while in rats is about 42 min (Carmines *et al.*, 2003, Carmines and Rajendran, 2008).

In smoke inhalation studies, the blood HbCO measurements should be performed to demonstrate that the gaseous phase of the smoke was inhaled into the lungs, ideally accompanied by analysis of the pulmonary deposition of constituents of the smoke particulate phase, such as plasma nicotine and cotinine (Coggins, 2001).

Although cotinine is a gold-standard technique in the assessment of tobacco exposure, many studies have used other markers such as nicotine and/or CO (Esposito *et al.*, 2008, Farkas *et al.*, 2006, Rajini *et al.*, 1994). The use of different markers makes it difficult to compare the results reported in the literature and those observed in this study, which used cotinine as a marker. We found a mean cotinine value of 42.5 ng/mL with no apparent signs of intoxication in the exposed animals. The amount of cotinine observed in animal models can vary widely in the literature (from 4.7 ng/mL to 572 ng/mL) (Jardim *et al.*, 2010, Mello *et al.*, 2005a, Ng *et al.*, 2006, Small *et al.*, 2010). Many factors contribute to such variations in the cotinine concentration: different times of exposure, rats exposed during pregnancy or not, different intervals between exposures, and different brands of cigarettes. Furthermore, we can also consider the time between the tobacco exposure and collection of biological samples, and the different techniques used to analyze cotinine levels. The results of cotinine and HbCO observed in our study, confirm that the method used was effective.

In relation to birth weight in animals exposed to tobacco during the intrauterine period, lower weight was observed when compared to other groups. This result corroborates previous findings (Carmines and Rajendran, 2008, Farkas *et al.*, 2006, Rajini *et al.*, 1994, Seller and Bnait, 1995).

One of the factors that influence birth weight is maternal weight gain during pregnancy. The group exposed to tobacco smoke showed a pattern of maternal weight gain significantly different from the other groups, in agreement with the literature (Carmines and Rajendran, 2008, Gaworski *et al.*, 2004, Mello *et al.*, 2006). Food intake can contribute to weight gain during pregnancy, however, no difference was observed between groups in our study. These results also were observed by other authors (Carmines *et al.*, 2003, Gaworski *et al.*, 2004). Furthermore, the manipulation to which the tobacco and manipulated control group were subjected was not able to alter the pattern of weight gain, since the animals of this latter group showed similar results to the control group. Moreover, other studies have shown an association between smoking and thyroid dysfunction, and therefore a change in basal metabolism (Soldin *et al.*, 2009, Tziomalos and Charsoulis, 2004). Thus, we suggest that changes in basal metabolism could alter the pattern of weight gain. It should be noted that many other factors could be involved, that need to be elucidated.

Human studies report that maternal smoking during the fetal period was associated not only with reduced birth weight, but also the length at birth (Shankaran *et al.*, 2004, Vardavas *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2011). In animals, there are few studies that investigated the relationship between length at birth and exposure to tobacco during the fetal period. In our study, there was no difference between groups in length at birth. Esposito *et al.* (2008) demonstrated that mice exposed active or passively to tobacco smoke had smaller birth length. A similar result was observed by Mello *et al.* (2007). One possible explanation for the different observed results could be attributed to the reduced tobacco exposure in our study compared with the studies cited.

In mammals, the major determinant of intrauterine growth is the placental nutrient supply, which, in turn, depends on the size, morphology, blood supply and transporter

abundance of the placenta, and on synthesis and metabolism of nutrients and hormones by the uteroplacental tissues (Fowden *et al.*, 2006).

No significant difference was found in placental weight in this study. The studies that evaluated exposure to tobacco and placental weight in rodents are scarce and controversial. Bassi *et al.* (1984) also found no difference in placental weight. However, other studies showed different results, demonstrating lower placental weight in animals exposed to tobacco (Brandini *et al.*, 2005, Seller and Bnait, 1995). It is known that the weight of placenta correlates with food intake in mammals (Belkacemi *et al.*, 2010). Thus, similar food intake pattern observed between groups in our study may be a possible explanation to the absence of differences in placental weight.

In humans, studies have shown that maternal smoking was not associated with placental weight (Picone *et al.*, 1982, Rodriguez-Moran *et al.*, 2007). The placenta responds to hypoxia by increasing in size in an attempt to supply the metabolic demands (Naeye, 1987). Probably the lower birth weight may be related to structural and functional alterations of the placenta. Finally, we would like to emphasize the limitations of comparing different species, because in humans the placental weight progressively increases throughout pregnancy, whereas in rodents it reaches a plateau in the mid to late pregnancy and then declines (Fowden *et al.*, 2006).

Pups exposed to tobacco smoke during the intrauterine period had significantly lower serum glucose and serum insulin levels. Metabolic changes as low concentrations of insulin and glucose are widely reported in the IUGR in humans (Hay, 2006, Murphy *et al.*, 2006, Nieto-Diaz *et al.*, 1996). Glucose is the main energy substrate for the fetus and the placenta (Diderholm, 2009). In response to prolonged malnutrition, the fetus changes its metabolic rate, hormone production and tissue sensitivity to these hormones (Byrne and Phillips, 2000, Martin-Gronert and Ozanne, 2007). Thereby, hypoglycemia is an essential adaptation that

promotes glucose transport across the placenta by increasing the transplacental plasma glucose concentration gradient. The serum glucose reduction leads to a reduction of the insulin which appears to be a mechanism of adaptation to limit the growth. These mechanisms are meant to give the fetus optimal chance of survival in the postnatal life (Martin-Gronert and Ozanne, 2007, Thorn *et al.*, 2011).

## **5. CONCLUSIONS**

The animal model used in our study was useful for exposure to tobacco smoke during the intrauterine period. The biochemical results, adding to the low birth weight, showed that exposure to tobacco, under the present conditions, produced a small but significant intrauterine growth restriction.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the financial support from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA); Brazilian National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) and the Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Brazil. I.C.R.W. and F.U.F. were supported by Post-doctoral fellowships from CAPES.

## **REFERENCES**

Bakker H, Jaddoe VW. Cardiovascular and metabolic influences of fetal smoke exposure. *Eur J Epidemiol* 2011;26:763-70.

Barradas L. Involuntary exposure to tobacco smoke in children. Smoking in young people. *Rev Port Pneumol* 2011;17:3-4.

Bassi JA, Rosso P, Moessinger AC, Blanc AB, James LS. Fetal growth retardation due to maternal tobacco smoke exposure in the rat. *Pediatr Res* 1984;18:127-30.

Belkacemi L, Nelson DM, Desai M, Ross MG. Maternal Undernutrition Influences Placental-Fetal Development. *Biol Reprod* 2010;83:325-31.

Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 1996;18:188-204.

Brandini DA, Sala MA, Lopes RA, Semprini M, Contrera MGD. Effects of cigarette smoke on the Meckel's cartilage of rat fetus: morphologic, morphometric and stereologic study. *Braz Dent J*. 2005;16:62-6.

Byrne CD, Phillips DI. Fetal origins of adult disease: epidemiology and mechanisms. *J of Clin Pathol*. 2000;53:822-8.

Carmines EL, Gaworski CL, Faqi AS, Rajendran N. In utero exposure to 1R4F reference cigarette smoke: Evaluation of developmental toxicity. *J Toxicol Sci*. 2003;75:134-47.

Carmines EL, Rajendran N. Evidence for Carbon Monoxide as the Major Factor Contributing to Lower Fetal Weights in Rats Exposed to Cigarette Smoke. *J Toxicol Sci*. 2008;102:383-91.

Coggins CRE. Review Article: A Review of Chronic Inhalation Studies with Mainstream Cigarette Smoke, in Hamsters, Dogs, and Nonhuman Primates. *Toxicol Pathol*. 2001;29:550-7.

Diderholm B. Perinatal energy metabolism with reference to IUGR & SGA: studies in pregnant women & newborn infants. *Indian J Med Res*. 2009;130:612-7.

Esposito ER, Horn KH, Greene RM, Pisano AM. An animal model of cigarette smoke-induced in utero growth retardation. *Toxicology*. 2008;246:193-202.

Farkas S, Hussein J, Ariano RE, Sitar DS, Hasan SU. Prenatal cigarette smoke exposure: Pregnancy outcome and gestational changes in plasma nicotine concentration, hematocrit, and carboxyhemoglobin in a newly standardized rat model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;214:118-25.

Fowden AL, Ward JW, Wooding FPB, Forhead AJ, Constancia M. Programming placental nutrient transport capacity. *J Physiol*. 2006;572:5-15.

Gaworski CL, Carmines EL, Faqi AS, Rajendran N. In utero and lactation exposure of rats to 1R4F reference cigarette mainstream smoke: Effect on prenatal and postnatal development. *J Toxicol Sci*. 2004;79:157-69.

Gonçalves-Silva RMV, Lemos-Santos MGF, Botelho C. Influência do tabagismo no ganho ponderal, crescimento corporal, consumo alimentar e hídrico de ratos. *J Pneumol* 1997;23:124-30.

Hay WW, Jr. Placental-fetal glucose exchange and fetal glucose metabolism. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2006;117:321-39; discussion 39-40.

Jardim JR, Bizeto L, Mayer AF, Camelier A, Rosa FW, Oliveira D, et al. An Inhalation Chamber Model for Controlled Studies of Tobacco Smoke Toxicity in Rodents. *Arch Bronconeumol ((English Edition))*. 2010;46:455-8.

Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Experimental IUGR and later diabetes. *J Intern Med.* 2007;261:437-52.

Mello PRB, Okay TS, Botelho C. The effects of exposing rats to cigarette smoke on milk production and growth of offspring. *J Pediatr.* 2007;83:267-73.

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* 2005a;14:289-93.

Mello PRBd, Okay TS, Botelho C. Influência da exposição a 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;28:143-50.

Mello PRBd, Okay TS, Dores EFGdC, Botelho C. Avaliação de um sistema de exposição tabágica passiva em modelo experimental utilizando cotinina e carboxiemoglobina como marcadores de exposição. *Pulmão RJ.* 2005b;14:228-36.

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;27:141-69.

Naeye RL. Do Placental Weights Have Clinical Significance? *Obstet Gynecol Surv.* 1987;42:678-80.

Ng SP, Steinetz BG, Lasano SG, Zelikoff JT. Prenatal Exposure to Cigarette Smoke Induces Diet-and-Sex-Dependent Dyslipidemia and Weight Gain in Adult Murine Offspring. *Environ Health Perspect.* 2009;117:1042-8.

Nieto-Diaz A, Villar J, Matorras-Weinig R, Valenzuela-Ruiz P. Intrauterine growth retardation at term: association between anthropometric and endocrine parameters. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1996;75:127-31.

O'Dell LE, Khroyan TV. Rodent models of nicotine reward: What do they tell us about tobacco abuse in humans? *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;91:481-8.

Petersen GO, Leite CE, Chatkin JM, Thiesen FV. Cotinine as a biomarker of tobacco exposure: Development of a HPLC method and comparison of matrices. *J Sep Sci.* 2010;33:516-21.

Picone TA, Allen LH, Olsen PN, Ferris ME. Pregnancy outcome in North American women. II. Effects of diet, cigarette smoking, stress, and weight gain on placentas, and on neonatal physical and behavioral characteristics. *Am J Clin Nutr.* 1982;36:1214-24.

Rajini P, Last JA, Pinkerton KE, Hendrickx AG, Witschi H. DECREASED FETAL WEIGHTS IN RATS EXPOSED TO SIDESTREAM CIGARETTE-SMOKE. *Fundam Appl Toxicol.* 1994;22:400-4.

Rodriguez-Moran M, Levario-Carrillo M, Gonzalez JL, Sanchez-Ramirez B, Martinez-Aguilar G, Guerrero-Romero F. Placental immaturity and hyperinsulinaemia in full-term newborns. *Eur J Clin Invest.* 2007;37:529-34.

Scherer G, Richter E. Biomonitoring exposure to environmental tobacco smoke (ETS): A critical reappraisal. *Hum Exp Toxicol.* 1997;16:449-59.

Seller MJ, Bnait KS. Effects of tobacco smoke inhalation on the developing mouse embryo and fetus. *Reprod. Toxicol.* 1995;9:449-59.

Shankaran S, Das A, Bauer CR, Bada HS, Lester B, Wright LL, et al. Association Between Patterns of Maternal Substance Use and Infant Birth Weight, Length, and Head Circumference. *Pediatrics.* 2004;114:e226-e34.

Slotkin TA. Fetal nicotine or cocaine exposure: Which one is worse? *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285:931-45.

Small E, Shah H, Davenport J, Geier J, Yavarovich K, Yamada H, et al. Tobacco smoke exposure induces nicotine dependence in rats. *Psychopharmacology.* 2010;208:143-58.

Soldin OP, Goughenour BE, Gilbert SZ, Landy HJ, Soldin SJ. Thyroid hormone levels associated with active and passive cigarette smoking. *Thyroid.* 2009;19:817-23.

Thorn SR, Rozance PJ, Brown LD, Hay WW. The Intrauterine Growth Restriction Phenotype: Fetal Adaptations and Potential Implications for Later Life Insulin Resistance and Diabetes. *Semin Reprod Med.* 2011;29:225,36.

Tziomalos K, Charsoulis F. Endocrine effects of tobacco smoking. *Clin Endocrinol.* 2004;61:664-74.

Vardavas C, Chatzi L, Patelarou E, Plana E, Sarri K, Kafatos A, et al. Smoking and smoking cessation during early pregnancy and its effect on adverse pregnancy outcomes and fetal growth. *Eur J Pediatr.* 2010;169:741-8.

Wickstrom R. Effects of Nicotine During Pregnancy: Human and Experimental Evidence. *Curr Neuropharmacol.* 2007;5:213-22.

World Health Organization. Environmental Health Criteria 213: Carbon Monoxide (Second Edition) In: International Programme on Chemical Safety I-OPftSMoC, editor. SECOND ed. Geneva: World Health Organization; 2003.



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

Zhang L, González-Chica DA, Cesar JA, Mendoza-Sassi RA, Beskow B, Larentis N, et al. Tabagismo materno durante a gestação e medidas antropométricas do recém-nascido: um estudo de base populacional no extremo sul do Brasil. Cad Saúde Pública. 2011;27:1768-76.

### **Tables:**

**Table 1**

Concentration of serum cotinine.

<b>Groups</b>	<b>Cotinine (ng/mL)</b>
Control (n= 5)	< 10
Manipulated Control (n= 4)	< 10
Tobacco (n= 5)	42.52 ± 4.33

Data are presented as mean ± SD.

**Table 2**

Food intake/24h throughout the gestation.

<b>Groups</b>	<b>Day 3(g)</b>	<b>Day 10(g)</b>	<b>Day 17(g)</b>
Control (n =8)	20.16 ± 2.82	30.27 ± 16.11	25.56 ± 5.08
Manipulated Control (n =11)	20.80 ± 2.98	22.01 ± 3.08	25.04 ± 1.49
Tobacco (n =9)	20.39 ± 3.46	21.28 ± 2.79	30.54 ± 11.61

Data are presented as mean ± SD. \* $P=0.397$  (Repeated-measures ANOVA).

**Table 3**

Analysis of maternal serum glucose.

<b>Groups</b>	<b>Glucose (mg/dL)</b>
Control (n= 5)	90.77 ± 5.15
Manipulated Control (n= 4)	79.37 ± 7.49
Tobacco (n= 5)	94.0 ± 6.17

One-way ANOVA, using as covariate the number of pups/litter,  $P= 0.380$ ). Data are presented as mean ± SD.

**Table 4**

Variables related to fetal growth: birth length, placental weight and percentage of the placenta/birth weight of the pups.

<b>Variables</b>	<b>Control (n=53)</b>	<b>Manipulated Control (n=44)</b>	<b>Tobacco (n= 57)</b>	<b>P</b>
Length (cm)	4.59 ± 0.30	4.58 ± 0.47	4.57 ± 0.46	0.896
Placental weight (g)	0.471 ± 0.02	0.475 ± 0.01	0.417 ± 0.02	0.209
Percentage of the placenta/weight of the puppy (%)	8.12 ± 0.32	8.47 ± 0.35	7.7 ± 0.48	0.478

Analyzed by GEE, using as covariates the number of pups/litter, pups gender and the different breeder of progenitor. Data are presented as mean ± SD.

**Figure captions:**

**Fig. 1.** Apparatus used for procedure to tobacco exposure of animals.

**Fig. 2.** Carboxyhemoglobin levels after acute exposure to tobacco. There is a significant increase in carboxyhemoglobin levels. Results are presented as mean ± SD. \* $P < 0.001$  (Student t-test), n=6/group.

**Fig. 3.** Weight gain throughout the 3 weeks of pregnancy for control (n = 11) manipulated control (n = 11) and tobacco exposure (n = 9) groups. There was a significant difference in the weight gain between tobacco exposed group and the others groups. Data are presented as mean ± SD. \* $P=0.002$  (GEE).

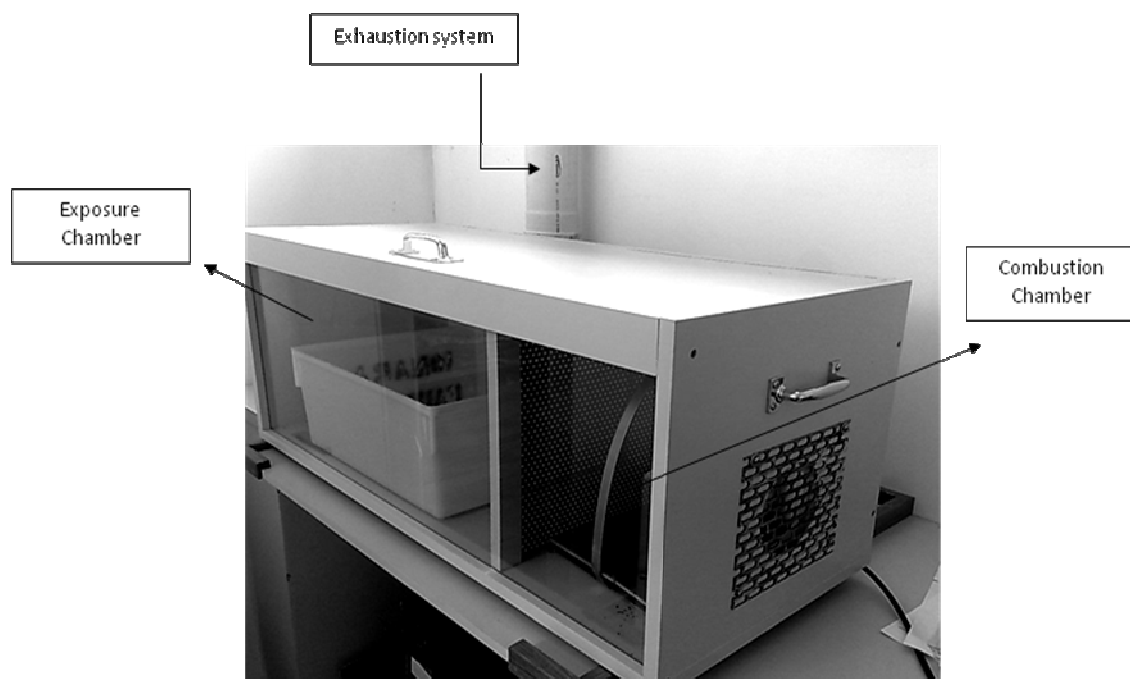
**Fig. 4.** Effect of prenatal exposure to tobacco smoke on birth weight of pups. The tobacco group showed decreased birth weight. GEE analysis used as covariates the number of pups/litter, the pups' gender and the different breeder of progenitor. \* $P= 0.005$ , n= 44-57 pups/group. Data are presented as mean ± SD.

**Fig. 5.** Analysis of serum glucose levels (mg/dL) of pups. Tobacco group showed decreased serum glucose levels compared with the control group. No difference was observed between manipulated control group and other groups. Analyzed by GEE, using as covariates the number of pups/litter, the pup gender, the mean birth weight of the litter and the breeder of progenitor. Data are presented as mean  $\pm$  SD, \* $P$ < 0.0001, n= 11 pups/group.

**Fig. 6.** Analysis of serum insulin levels ( $\mu$ U/mL) of pups between groups. Tobacco group showed significantly lower levels of serum insulin compared with other groups. GEE analysis used as covariates the number of pups/litter, the pup gender, mean birth weight of the litter and the origin of progenitor. Data are presented as mean  $\pm$  SD, \* $P$ < 0.009, n= 11 pups/group.

### **Figures:**

**Figure 1**



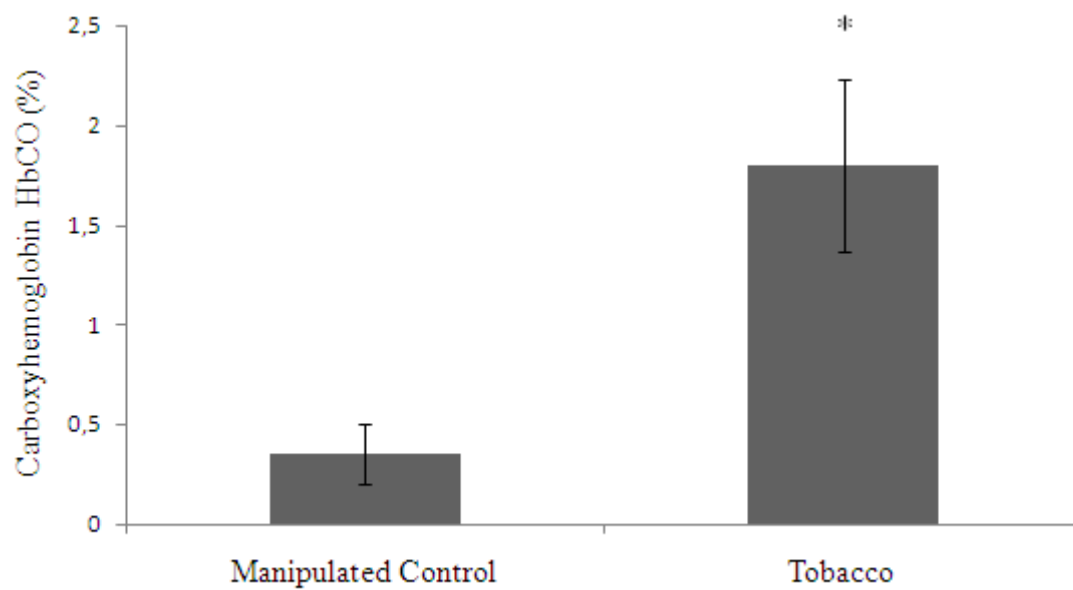
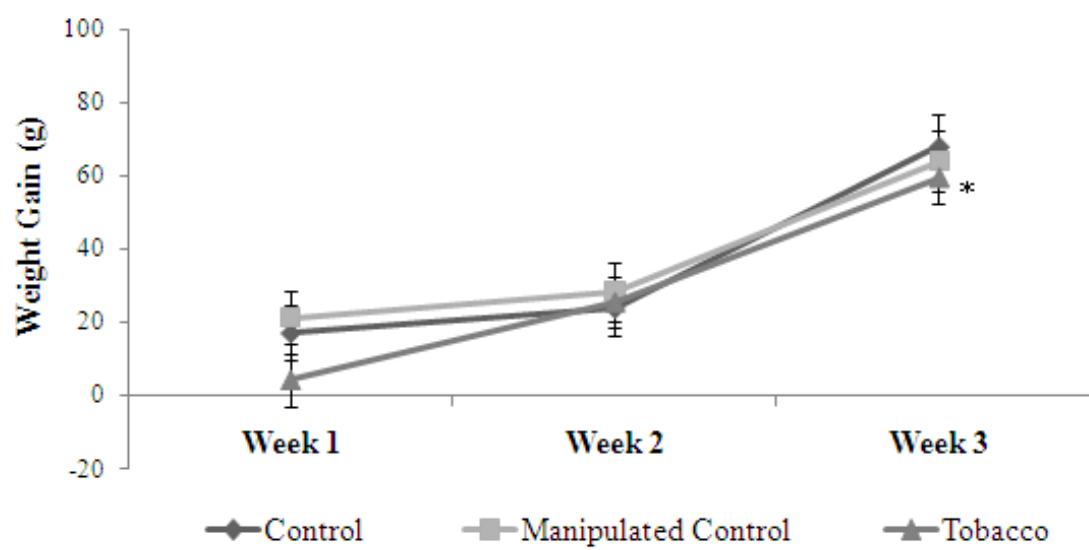
**Figure 2****Figure 3**

Figure 4

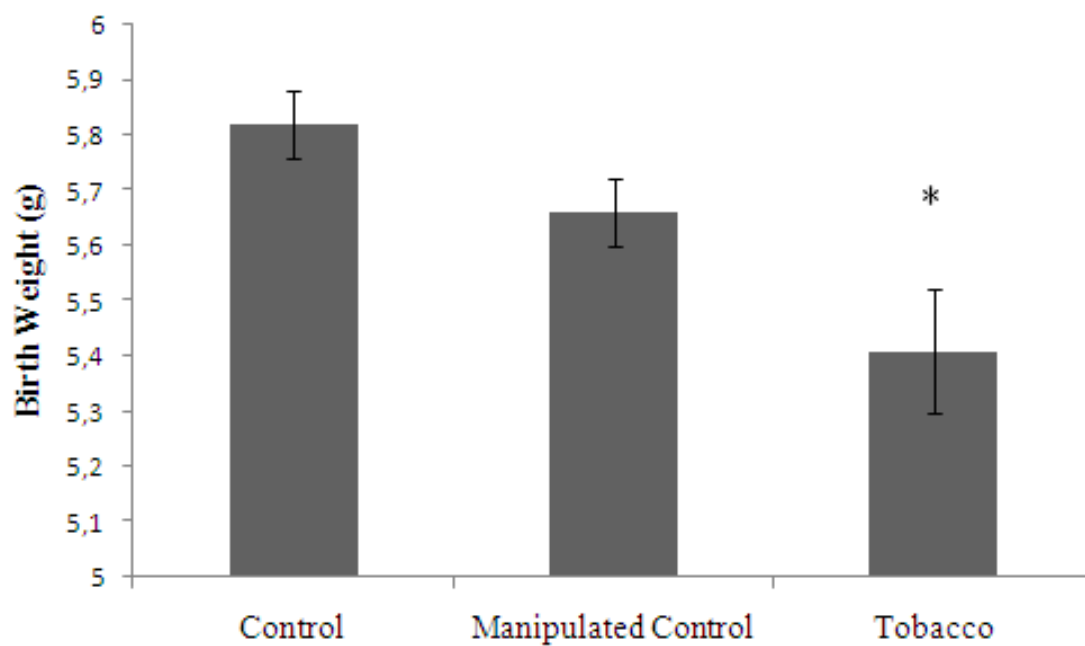
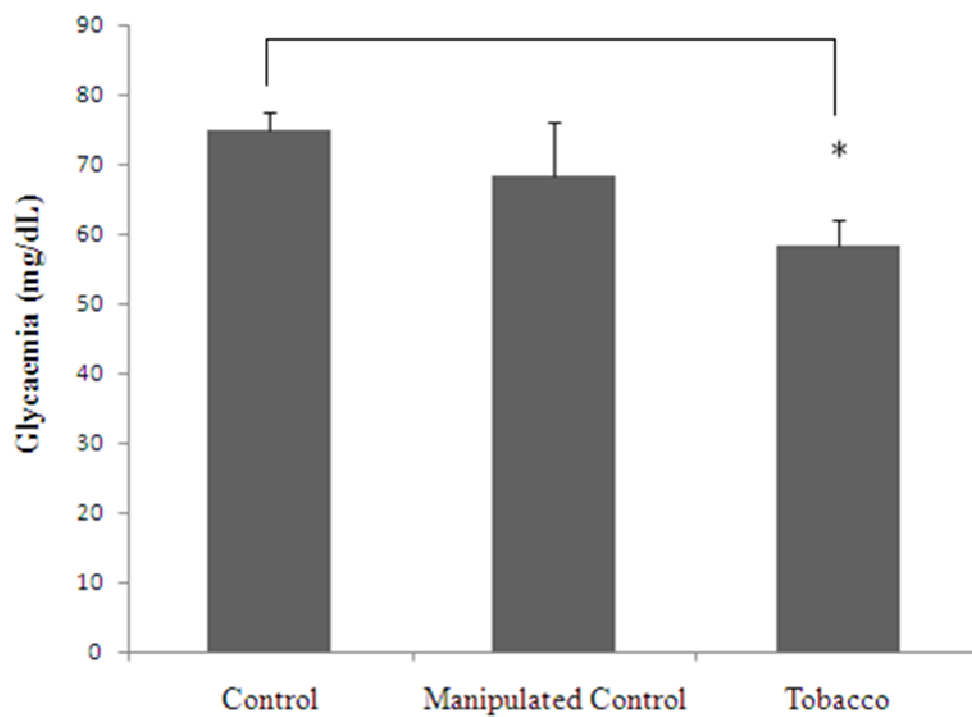


Figure 5



**Figure 6**