



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde

BRUNA CORRAL GARCIA DE ARAUJO

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NO
MIOCÁRDIO DE RATAS DURANTE PREENHEZ
E LACTAÇÃO
SUBMETIDAS AO TABAGISMO PASSIVO

São José do Rio Preto
2017

Bruna Corral Garcia de Araujo

**Efeito do Exercício Físico no
Miocárdio de Ratas Durante
Prenhez e Lactação Submetidas ao
Tabagismo Passivo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva
Souza

São José do Rio Preto
2017

Ficha Catalográfica

de Araujo, Bruna Corral Garcia

Análise do Miocárdio de Ratas Durante Prenhez e Lactação
Submetidas ao Tabagismo Passivo Associado ao Exercício
Físico/ Bruna Corral Garcia de Araujo
São José do Rio Preto, 2017
61p.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de São José do Rio
Preto - FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

1. Prenhez; 2. Lactação; 3. Tabagismo Passivo;
4. Exercício Físico; 5. Miocárdio.

Bruna Corral Garcia de Araujo

**Efeitos do Exercício Físico no Miocárdio de Ratas
Durante Prenhez e Lactação Submetidas ao Tabagismo
Passivo**

BANCA EXAMINADORA
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi S. Souza

2º Examinador: _____

3º Examinador: _____

4º Examinador: _____

5º Examinador: _____

Suplentes: _____

São José do Rio Preto, _____ / _____ / _____

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas e Quadros.....	vii
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas.....	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Objetivo Geral.....	08
1.1.1 Objetivos Específicos.....	08
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1. Desenho do Estudo.....	10
2.2. Caracterização da Amostra.....	10
2.3. Grupos Experimentais.....	11
2.4. Protocolo de Exposição à Fumaça de Cigarro.....	11
2.5. Protocolo do Programa de Natação.....	14
2.6. Obtenção das Amostras Biológicas.....	17
2.7. Análises Morfológicas.....	18

2.8 Dimensão fractal.....	19
2.9. Análises Estatísticas.....	21
3. RESULTADOS.....	22
3.1. Peso Corporal e do Coração.....	23
3.2. Morfometria.....	26
3.3. Dimensão Fractal.....	37
4. DISCUSSÃO.....	41
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS.....	49
APÊNDICE.....	62

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese primeiramente a Deus, ao meu marido, João Rafael Santos de Araujo, que tem sido meu suporte e incentivo a cada dia, e a meu pai, Marcos José Garcia que nunca deixou de me apoiar.

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu marido, João Rafael, por toda compreensão, amor e paciência no dia a dia, sempre com palavras de ânimo e incentivo.

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

Ao meu pai, Marcos, por se preocupar comigo, me apoiar, me dar carinho e condições para continuar. Sem sua ajuda e dedicação não chegaria até aqui. Da mesma maneira, agradeço à minha madrastra Lenice.

À minha orientadora, Dra Dorotéia, por primeiramente ter depositado sua confiança em mim e ter me proporcionado condições para crescer, tanto cientificamente e em conhecimento, mas também como pessoa.

À minha professora, co-orientadora, Dra Susimary, que sempre brincando, com bom humor, me ensinou, me aconselhou e me ajudou a me tornar uma pessoa e uma profissional melhor.

Aos meus eternos orientadores, Prof. Zeca e Profa. Regina, que são mais que professores, são grandes amigos, aos quais tenho eterna gratidão e admiração.

Ao secretário da Pós-graduação da FAMERP, Luis Henrique, por toda atenção dispensada e orientações prestadas.

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

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

Aos amigos da UNOESTE, Ana Karênina e Francis, que colaboraram no desenvolvimento deste estudo, e todos os professores do curso de Estética e Cosmética que me apoiaram, assim como, a reitoria.

Aos familiares, avós, sogros, tios e primos, que mesmo distantes estavam torcendo por mim. Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais um capítulo de minha história.

**“Tudo tem o seu tempo determinado,
e há tempo para todo o propósito
debaixo do céu.” Bíblia Sagrada -
Eclesiastes 3:1**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Gaiola individual utilizada para alojar os animais.....10
- Figura 2: Fluxograma com o protocolo de tabagismo passivo, ao qual foram expostos ratas prenhes e em lactação.....12
- Figura 3: Fotografia ilustrando a câmara de inalação de fumaça de cigarro ou ar comprimido, para exposição das ratas prenhes e em lactação.....13
- Figura 4: Esquema de exposição à fumaça de cigarro ou ar comprimido, utilizado na experimentação com ratas prenhes e em lactação.....14
- Figura 5: Fluxograma utilizado no protocolo de natação para ratas prenhes ou em lactação.....15
- Figura 6: Fotografia mostrando o ambiente utilizado na fase de adaptação ao treinamento de natação de ratas prenhes ou em lactação.....15
- Figura 7: Fotografia ilustrando o ambiente utilizado no programa de natação de ratas prenhes ou em lactação.....16
- Figura 8: Fotografia mostrando a caixa para secagem de ratas prenhes ou em lactação, após cada sessão do protocolo de natação.....17

Figura 9:	A e B: representação do método de <i>Box-Couting</i>	20
Figura 10:	Medidas de ratas prenhes expostas ou não à fumaça de cigarros e submetidas ou não a protocolo de natação.....	24
Figura 11:	Medidas da prole de ratas prenhes expostas ou não à fumaça de cigarros e submetidas ou não a protocolo de natação.....	25
Figura 12:	A: Fotomicrografia de corte histológico de miocárdio de ratas prenhez corado com hematoxilina-eosina (aumento de 40x); B – Processo de binarização, em que os núcleos são pretos e o restante da célula apresenta-se branco.....	37
Figura 13:	A – Fotomicrografia de corte histológico do miocárdio de ratas em lactação corado com hematoxilina-eosina (aumento de 40x); B – Processo de binarização, em que os núcleos são pretos e o restante da célula apresenta-se em branco.....	38
Figura 14:	Regressão linear considerando quantidade e tamanho da caixa em grupos de ratas prenhes.....	39
Figura 15:	Regressão linear, considerando quantidade e tamanho da caixa em grupos de ratas prenhes e em lactação.....	40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Valores de mediana, mínimo e máximo da área de cardiomiócitos, após prenhez em ratas submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.....26
- Tabela 2: Valores de mediana, mínimo e máximo da área dos cardiomiócitos, após lactação em ratas submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.....27
- Tabela 3: Valores de mediana, mínimo e máximo do perímetro do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.....28
- Tabela 4: Valores de mediana, mínimo e máximo do diâmetro médio do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.....29
- Tabela 5: Valores de mediana, mínimo e máximo do diâmetro maior e menor do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhez e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.....30

Tabela 6:	Valores de mediana, mínimo e máximo do volume do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.....	31
Tabela 7:	Valores de mediana, mínimo e máximo da área do núcleo de cardiomiócito em ratas prenhez e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.....	32
Tabela 8:	Valores de mediana, mínimo e máximo da relação volume e área do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.....	33
Tabela 9:	Valores de mediana, mínimo e máximo de forma do núcleo do cardiomiócito em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.....	34
Tabela 10:	Valores de mediana, mínimo e máximo do índice de contorno do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.....	35

Tabela 11:	Valores de mediana, mínimo e máximo da excentricidade do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.....	36
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
DCV	Doença Cardiovascular
%	Porcentagem
g	Gramma
cm	Centímetro
PA	Pressão arterial
°C	Graus Celsius / centígrado
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
GFP	Grupo exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez
GFNP	Grupo submetido à fumaça de cigarro e natação na prenhez
GNP	Grupo em programa de natação durante a prenhez
GCP	Grupo controle na prenhez
GFL	Grupo exposto à fumaça de cigarro na prenhez e lactação
GFNL	Grupo submetido à fumaça de cigarro e a natação na prenhez e lactação
GCL	Grupo controle com animais prenhes e em lactação
GNL	Grupo submetido ao programa de natação durante prenhez e lactação
ppm	Partes por milhão
mg	Miligrama
µm	Micrometro
min	Minuto
HE	Hematoxilina-Eosina
M	Diâmetro médio
x	Vezez
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
D	Diâmetro Maior
d	Diâmetro menor
P	Perímetro
V	Volume
F	Coefficiente de forma
I	Índice de contorno

E	Excentricidade
NIH	Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos
N	Números de quadrados
L	Lados
d	Dimensão

RESUMO

Introdução – O tabagismo passivo é reconhecido como um fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV). O exercício físico tem sido amplamente indicado para prevenção e tratamento de DCV, tendo em vista que se praticado regularmente promove alterações metabólicas, neuromusculares e cardiovasculares benéficas, tanto para a mãe quanto para o feto. **Objetivos** – Avaliar o impacto do exercício físico por meio da natação durante prenhez e lactação, com análise morfométrica, cariométrica, e dimensão fractal de miocárdio em ratas submetidas a tabagismo passivo, e sua prole considerando-se o peso corporal e do coração, assim como também nas mães. **Material e Métodos** – Foram estudadas 48 ratas distribuídas em oito grupos, sendo quatro com prenhez: GFP – exposto à fumaça de cigarro; GFNP – fumaça de cigarro e natação; GNP – apenas natação; GCP – controle; e os outros quatro grupos com prenhez e em lactação: GFL – exposto à fumaça de cigarro; GFNL – fumaça de cigarro e natação; GNL – apenas natação; GCL – controle. O protocolo de exposição à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação foi de 30 minutos, duas vezes ao dia, por seis semanas. Nesse mesmo período foi iniciado o programa de natação, por 60 minutos diários até o 21º dia de amamentação. O peso corporal foi registrado ao final do experimento. Após eutanásia, o coração das mães e das respectivas proles foi pesado, e o miocárdio das mães submetido à análise histomorfométrica com mensuração da área dos cardiomiócitos; cariometria e dimensão fractal. Admitiu-se nível de significância para valor- $P < 0,05$. **Resultados** – Após o período de lactação, o grupo GNL mostrou aumento de peso corporal, comparado ao grupo exposto ao protocolo de natação associado à fumaça de cigarros (GFNL; $P = 0,026$). Em relação aos filhotes, a prole de ratas expostas à fumaça e à natação (GFNP) mostrou redução no peso corporal ($22,547 \pm 4,68g$), comparada à prole de ratas expostas somente à fumaça (GFP: prole= $26,452 \pm 4,59g$; $P = 0,003$) e à prole de ratas sem exposição e não inseridas no

programa de natação (GCP: prole=34,47±7,81g; P=0,001). A prole do GFNP apresentou também valores reduzidos no peso do coração (0,157±0,027g), comparada à prole de ratas submetidas à natação (GNP: prole = 0,251±0,033g; P=0,004). Houve aumento da área de cardiomiócitos nas ratas prenhes expostas à fumaça de cigarros e ao protocolo de natação (GFNP: mediana=267,74µm²), comparado ao grupo controle (GCP=252,97µm²; P=0,044), assim como ao grupo submetido ao programa de natação (GNP=251,48µm²; P=0,022). Já, durante prenhez e lactação, destacou-se o grupo submetido apenas à natação (GNL), com valores aumentados da área de cardiomiócitos (290,08µm²), comparado ao grupo do programa de natação associado ao tabagismo passivo (GFNL=241,96µm²; P<0,0001). Cariometria e dimensão fractal não mostraram diferença entre os grupos (P>0,05).

Conclusão – Tabagismo passivo associado à natação em período de prenhez e lactação influencia a redução de peso corporal em ratas, assim como, na prole que apresenta também redução do peso do coração. Por outro lado, a prática de natação em ambos os períodos influencia hipertrofia do músculo cardíaco em ratas, mesmo na exposição ao tabagismo passivo durante a prenhez, sugerindo manutenção do desempenho contrátil do coração.

Palavras-chave: Prenhez, Lactação, Tabagismo Passivo, Exercício Físico, Miocárdio.

ABSTRACT

Introduction - Passive smoking is recognized as a risk factor for cardiovascular disease (CVD). Physical exercise has been widely pointed out to prevent and treat CVD; taking into account that regular practice provides beneficial metabolic, neuromuscular and cardiovascular changes for both mother and fetuses. **Objectives** – To evaluate the impact of physical exercise through swimming during the period of pregnancy and lactation, with morphometric, cariometric and fractal dimension analyses of the myocardium in rats submitted to passive smoking, and their offspring considering, in this case, body and heart weight, as well as in the mothers. **Material and Methods** – Forty-eight female rats divided into eight groups were studied; four of them pregnant: GFP - exposed to cigarette smoking; GFNP - cigarette smoking and swimming; GNP - just swimming; GCP – control; and other four groups with pregnancy and in lactation: GFL - exposed to cigarette smoking; GFNL - cigarette smoking and swimming; GNL - just swimming; GCL - control. During pregnancy and lactation, the protocol for cigarette smoking exposition was 30 minutes twice a day for six weeks. At this same period, the swimming program was started for 60 minutes a day up to the 21st day of breastfeeding. Body weight of all animals was recorded at the end of the experiment. After euthanasia, the heart of mothers and their offspring were weighed, and the mothers' myocardium also submitted to histomorphometric analysis with measurement of the cardiomyocyte area; cariometry and fractal dimension. P-value<0.05 was used for significance value. **Results** - After the lactation period, the group GNL showed increase in body weight as compared to those exposed to the swimming protocol associated to cigarette smoking (GFNL; P=0.026). In relation to offspring, the offspring of mothers exposed to smoking and swimming (GFNP) showed reduction in body weight ($22.547\pm 4.68\text{g}$) as compared to the offspring of mothers exposed to smoking (GFP: offspring = $26.452\pm 4.59\text{g}$; P=0.003) and to the group without

exposure and not included in the swimming program (GCP: offspring = 34.47 ± 7.81 g; $P=0.001$). GFNP offspring also presented reduced values in heart weight (0.157 ± 0.027 g) as compared to the offspring of mothers exposed to swimming (GNP: offspring= 0.251 ± 0.033 g; $P=0.004$). There was an increase in the area of cardiomyocytes in pregnant rats exposed to cigarette smoking and to the swimming protocol (GFNP: median= $267.74 \mu\text{m}^2$) as compared to pregnancy only (GCP= $252.97 \mu\text{m}^2$; $P=0.044$), as well as to the group submitted to the swimming protocol (GNP= $251.48 \mu\text{m}^2$; $P=0.022$). During pregnancy and lactation period, the group exposed to swimming protocol (GNL) was stood out with increased values of the area of cardiomyocytes ($290.08 \mu\text{m}^2$) as compared to the group of the swimming and passive smoking program (GFNL= $241.96 \mu\text{m}^2$; $P<0.0001$). Cariometry and fractal dimension showed no difference between the groups ($P>0.05$). **Conclusion** – Passive smoking associated with swimming during pregnancy and lactation period influences the reduction of body weight in female rats as well as the offspring, that also presents a reduction in heart weight. On the other hand, the swimming practice during both periods influences cardiac muscle hypertrophy in rats, even in exposure to passive smoking during pregnancy, suggesting maintenance of the contractile performance of the heart.

Key-words: Pregnancy, Lactation, Passive Smoking, Physical Exercise, Myocardium.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A fumaça do cigarro é complexa, dinâmica e reativa, e possui uma mistura com cerca de 5.000 produtos químicos. É um aerossol de gotículas líquidas suspensas em gases semi-voláteis, além de hidrocarbonetos aromáticos, nitrosaminas específicas do tabaco, fitoesteróis e metais, assim como fenol e cresóis (fenólicos). A fase gasosa contém nitrogênio e oxigênio, e também vários combustíveis, tais como monóxido e dióxido de carbono (CO e CO₂, respectivamente) e óxido nítrico. A nicotina, um alcalóide produzido nas raízes da planta de tabaco, é o principal composto viciante de fumaça do cigarro ⁽¹⁾.

O tabagismo passivo aumenta o risco de inúmeras doenças e tem sido em especial, um fator de risco responsável pelo aumento de 30% das doenças cardiovasculares (DCV)⁽²⁾. Os efeitos causados pelo cigarro no sistema cardiovascular contribuem para manifestações como trombose, aterosclerose, espasmo de artéria coronária, arritmias cardíacas e redução da capacidade do sangue em fornecer oxigênio⁽³⁾. Dentre os efeitos do fumo passivo destacam-se disfunção endotelial, alteração de lipoproteínas, inflamação e ativação plaquetária ⁽⁴⁾.

Vários fatores de risco para DCV ocorrem já na infância ⁽⁵⁻⁷⁾. Ressalta-se que exposições adversas ocasionam permanentes adaptações fetais em relação à estrutura, fisiologia e metabolismo. Estudos epidemiológicos demonstram que o baixo peso ao nascer está associado a risco aumentado de DCV, diabetes tipo 2 e obesidade ^(8,9). Reconhecidamente, o tabagismo materno é um dos fatores de risco adversos modificáveis mais importantes para o baixo peso ao nascer, nos países ocidentais ^(10,11).

Há referência de redução do peso em 236g nos bebês de gestantes que consomem acima de 10 cigarros por dia⁽¹²⁾. A nicotina, assim como CO e outras

substâncias contidas na fumaça do cigarro, é capaz de atravessar a placenta, entrar na circulação fetal e afetar seu desenvolvimento. Ressalta-se que CO pode influenciar, ainda, o fornecimento do oxigênio da criança ao nascer ⁽¹⁾.

O tabagismo materno, além de baixo peso ao nascer, provoca déficit do crescimento fetal, maior risco de prematuridade, aborto espontâneo e malformação congênita ⁽¹³⁾. A nicotina age, no organismo materno liberando catecolaminas causando, conseqüentemente, taquicardia, vasoconstrição periférica e redução da perfusão sanguínea uterina. Esta condição resulta em nutrição e oxigenação fetal deficientes ⁽¹⁴⁾.

Com relação a aspectos cardiovasculares, a exposição pré-natal ao cigarro foi associada com menor variabilidade da frequência cardíaca fetal e hipotensão no útero ⁽¹⁵⁾. Vários estudos ^(1,16-18) encontraram associação do tabagismo materno durante a gravidez com maior pressão sanguínea sistólica ou diastólica na infância. Nesse caso, a pressão elevada na prole está relacionada à disfunção endotelial, mudanças em estrutura e função renal e alterações perivascular no tecido adiposo, importante modulador da função vascular ⁽¹⁸⁾.

O tabagismo ativo está bem estabelecido como fator contribuinte para o parto prematuro ⁽¹⁹⁻²¹⁾. Por outro lado, é crescente a preocupação pela ação do tabagismo passivo, que é a exposição ao fumo ambiental do tabaco ou fumo passivo, que pode ocasionar também o parto prematuro ^(22,23), devido aos mesmos mecanismos biológicos do tabagismo ativo, no entanto, há divergências ⁽²⁴⁾. Verificou-se que a exposição à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação acarretou prejuízos morfométricos e séricos tanto nas mães como para a prole ⁽¹³⁾. Nesse caso, destaca-se a redução no peso da prole, mais frequente no grupo de gestantes fumantes passivas ⁽¹²⁾, correspondente a 79g comparado ao grupo de gestantes não fumantes ⁽²⁵⁾. Além disso, há influência

negativa também sobre o número e comprimento corporal dos filhotes, do nascimento ao desmame, assim como no desenvolvimento muscular⁽²⁶⁾.

Por outro lado, o exercício físico tem sido amplamente indicado e aplicado com o intuito de prevenir⁽²⁷⁾ e tratar DCV⁽²⁸⁾, tendo em vista que praticado regularmente promove alterações metabólicas, neuromusculares e cardiovasculares benéficas. Durante o exercício físico o coração é exposto a adaptações bioquímicas, elétricas, morfológicas e mecânicas, pelo aumento da atividade metabólica e mecânica, o que proporciona melhora na função cardíaca⁽²⁹⁾.

O mesmo acontece durante a gestação, em que a prática de exercício físico regular resulta em benefícios, tanto para a mãe quanto para o feto. Destacam-se entre os aspectos maternos melhora na função cardiovascular, controle do ganho de peso, diminuição do desconforto músculo-esquelético, diminuição da incidência de câibras musculares e de edema de membros inferiores, estabilidade do humor, e atenuação de diabetes mellitus e hipertensão gestacional⁽³⁰⁾. Dentre as alterações que ocorrem no sistema músculo-esquelético no período gestacional destacam-se abdômen protuso, devido o aumento do útero, marcha gingada ou anserina, hiperlordose lombar fisiológica, alteração do centro de gravidade, aumento do peso corporal, distensão muscular abdominal, aumento da pressão e de peso sobre a musculatura do assoalho pélvico e compressões⁽³¹⁾.

No sistema respiratório, além de alterações funcionais, acontecem alterações anatômicas devido a abertura gradual das últimas costelas, ao diafragma, que se eleva cerca de 4cm, ocasionando aumento do diâmetro transversal em 2cm. Como consequência, a respiração passa a ser predominantemente diafragmática em detrimento da costal. Já as alterações funcionais incluem o volume corrente e volume minuto que

aumentam progressivamente durante a gestação, assim como o aumento da frequência respiratória, entretanto, o espaço morto não se altera e o volume corrente é acomodado no espaço alveolar⁽³²⁾.

No sistema endócrino há alterações para atender às crescentes demandas do feto e para formação de reservas nos tecidos maternos, como aumento de 30% das necessidades de proteínas, carboidratos e lípidos, assim como de ferro, ácido fólico e cálcio. Pela ação do estrogênio, ocorre o relaxamento dos ligamentos, em especial os ligamentos da pelve e aumento da vascularização. Já, pela ação da progesterona e relaxina há redução do tônus dos músculos responsáveis pela estabilização dessas articulações. Também, pela ação hormonal ocorre retenção de água e sódio e aumento no ritmo de filtração glomerular, ocasionando edema de membros inferiores^(33,34).

As modificações hemodinâmicas e cardíacas que ocorrem durante a gestação, como a hipervolemia fisiológica da gravidez, garantem o suporte de oxigênio e nutrientes para o feto e protege a mãe contra a diminuição do retorno venoso, decorrente de compressão uterina e perda sanguínea no parto⁽³⁵⁾. Na gestação, a pressão arterial (PA) diminui até a vigésima semana, entretanto, aumenta até o dia do parto, com valores finais similares àqueles encontrados no início da gestação. Por outro lado, a frequência cardíaca de repouso aumenta abruptamente nos primeiros três meses, seguido de aumento moderado até o final da gestação, com aumento de 15-20 batimentos em relação aos valores não gravídicos⁽³⁶⁾.

A resistência vascular sistêmica também diminui durante a gravidez, até 25 semanas de gestação e, em seguida, gradualmente aumenta até o parto, enquanto a pressão sanguínea sistólica permanece inalterada⁽³⁷⁾. Ao mesmo tempo, o sistema renina-angiotensina é ativado aumentando, conseqüentemente, a secreção do hormônio

antidiurético para reter líquido e manter ou reduzir ligeiramente a pressão sanguínea ⁽³⁸⁾. Há também, remodelamento mediado pelo estrogênio no início da gestação causando redução do tônus vascular e, conseqüentemente, redução primária na pós-carga e aumento da capacitância, refletida no aumento do débito cardíaco em repouso, em torno de 50% acima dos valores não gravídicos ⁽³⁹⁾. Além disso, ocorre aumento das dimensões da cavidade ventricular sem aumento da espessura da parede e aumento da capacitância aórtica ⁽⁴⁰⁾.

Sabe-se que prática de atividade física regular, moderada, controlada e orientada pode produzir efeitos benéficos sobre a saúde da gestante e do feto, na qualidade de vida e na prevenção e/ou controle de diversas doenças ⁽⁴¹⁾. Antigamente, as gestantes eram aconselhadas a reduzirem suas atividades, especialmente durante o último trimestre da gestação, acreditando-se que o exercício aumentaria o risco de trabalho de parto prematuro por meio de estimulação da atividade uterina. Entretanto, o *American College of Obstetricians and Gynecologists* (1990) reconheceu que a prática da atividade física regular durante a gestação, deveria ser desenvolvida desde que a gestante não apresentasse contra indicação ⁽⁴²⁾. Em 2002, essa prática foi reconhecida como segura e indicada para todas as gestantes saudáveis ⁽⁴³⁾.

No âmbito musculo esquelético, o exercício reduz e previne as lombalgias, devido à hiperlordose e o conseqüente desvio do centro gravitacional. Além disso, minimiza dores nas mãos e membros inferiores, devido à diminuição da flexibilidade ⁽⁴⁴⁾. Com a prática regular de exercícios físicos há redução do estresse cardiovascular, diminuindo a frequência cardíaca e a PA, aumentando o volume sanguíneo e a capacidade de oxigenação e, assim, prevenindo trombose e varizes, e o risco de diabetes e hipertensão gestacional ⁽⁴⁵⁾. Outros aspectos a serem considerados

como benefícios do exercício físico são: diminuição das dores de parto com melhor recuperação pós-parto e redução do número de cesáreas ⁽⁴⁶⁾. Além disso, a satisfação da prática regular de exercício físico se estende aos aspectos emocionais, contribuindo para elevação da autoestima ⁽⁴⁷⁾.

A intensidade do exercício deve ser monitorada de acordo com os sintomas apresentados. É recomendação do *American College of Obstetricians and Gynecologists* que a atividade física na gestação, tenha por características exercícios de intensidade regular e moderada, com o programa voltado para o período gestacional. Nesse caso, as atividades devem ser centradas nas condições de saúde da gestante, na experiência em praticar exercícios físicos e na demonstração de seu interesse e necessidade ⁽⁴¹⁾.

As principais atividades físicas regulares indicadas para gestantes são exercícios leves na água, caminhada e bicicleta. A natação vem sendo a mais recomendada, devido à fluabilidade. Além disso, o exercício na água traz benefícios para os joelhos, é relaxante e reduz o edema de membros inferiores, sendo a temperatura ideal da água entre 28°C e 30°C⁽⁴⁸⁾.

Os efeitos cardiovasculares do tabagismo passivo e do exercício físico são conhecidos. Entretanto, torna-se necessário esclarecimento sobre o impacto de ambos na estrutura e função da musculatura cardíaca, particularmente em situação de prenhez e lactação. Para tal, é possível utilizar a dimensão fractal, termo criado pelo matemático francês Benoit Mandelbrot, originário do latim *fractus*, cujo significado é quebrado, fragmentado, para descrever alguns tipos de fenômenos espaciais e temporais. Este método foi empregado para avaliação das vilosidades terminais de placentas maduras de mulheres fumantes e não fumantes durante o terceiro trimestre da gravidez, utilizando-

se o *box-counting* ⁽⁴⁹⁾. Como também, foi aplicada na quantificação da rejeição celular miocárdica após o transplante cardíaco ⁽⁵⁰⁾.

O modelo animal com ratos tem sido uma alternativa para avaliar a gestação associada a exercícios físicos por meio de vários modelos, tanto na água ⁽⁵¹⁾, quanto em esteira ⁽⁵²⁾, ambos os exercícios aeróbios, indicados para a gestante. E o mesmo tem sido aplicado para a exposição ao tabagismo durante a gestação ⁽⁵³⁾.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto do exercício físico por meio da natação durante prenhez e lactação, considerando análises morfométrica, cariométrica e dimensão fractal de miocárdio em ratas submetidas a tabagismo passivo e sua prole.

1.1.1 Objetivos específicos

1. Mensurar o peso do coração e sua relação com o peso corporal em ratas antes e após prenhez e respectivas proles.
2. Identificar alterações morfológicas e morfométricas do tecido cardíaco, considerando área, volume e forma do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhez submetidas a tabagismo passivo.
3. Mensurar a dimensão fractal de cardiomiócitos de ratas após prenhez e lactação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Desenho do Estudo

Este estudo com delineamento experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP – Campus de Presidente Prudente (Processo no 24/2009), cumprindo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.2 Caracterização da Amostra

Foram utilizadas 48 ratas virgens em idade reprodutiva (90 dias) e oito ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albina, Rodentia, Mammalia), mantidos em gaiolas individuais, sob temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade de $50 \pm 10\%$, ciclo claro/escuro de 12 horas (7-19horas), e com livre acesso à água e ração padrão (Primor[®]).



Figura 1 - Gaiola individual utilizada para alojar os animais.

2.3 Grupos Experimentais

As ratas foram submetidas inicialmente a um esfregaço vaginal para verificação da fase do ciclo estral e, em seguida, alocadas por proximidade das fases em oito grupos com seis animais cada, sendo: GFP – Grupo exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP – Grupo submetido à fumaça de cigarro e programa de natação durante a prenhez; GNP – Grupo em programa de natação durante a prenhez; GCP – Grupo controle, com animais prenhes mantidos sem exposição à fumaça de cigarro e sedentários; GFL – Grupo exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez e lactação; GFNL – Grupo submetido à fumaça de cigarro e ao programa de natação durante a prenhez e lactação; GNL – Grupo submetido ao programa de natação durante a prenhez e lactação; GCL – Grupo controle com animais prenhes e em lactação mantidos sem exposição à fumaça de cigarro e sedentários. A fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro e diestro) foi determinada pela análise da celularidade vaginal, realizada por meio de um esfregaço diário entre 13 e 15 horas.

A verificação do ciclo estral foi realizada por mais uma semana após a divisão dos grupos e ao detectar o início da fase fértil (estro), as ratas foram colocadas em gaiolas individuais com um rato macho, onde permaneceram por uma noite para a cópula. Na manhã seguinte, a prenhez foi diagnosticada pela presença de espermatozóide no esfregaço vaginal, o que caracterizou o dia zero da prenhez ⁽⁵⁴⁾.

2.4 Protocolo de Exposição à Fumaça de Cigarro

A Figura 2 apresenta o fluxograma com o protocolo de tabagismo passivo, ao qual foram submetidos os animais. No primeiro dia de prenhez foi iniciado o protocolo de exposição à fumaça de cigarro, o qual foi dividido em duas fases: primeira, fase de

adaptação, compreendida pelos cinco primeiros dias, em que os animais dos grupos GFP, GFL, GFNP e GFNL foram expostos à fumaça de cigarro na câmara de fumo a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ⁽⁵⁵⁾, durante 10 minutos, uma vez ao dia, com 250 ppm (partes por milhão) de CO medido pelo detector de gás específico TxiPro® da Biosystems. A segunda fase ou fase experimental, passou a 30 minutos, duas vezes ao dia (manhã e tarde), seis dias por semana, com 350 ppm de CO₂ por exposição ⁽⁵⁶⁾. Os animais dos grupos GCP, GCL, GNP e GNL foram submetidos à inalação de 350 ppm de ar comprimido com as mesmas características de tempo e periodicidade dos animais expostos à fumaça de cigarro, até o final da prenhez ou lactação.

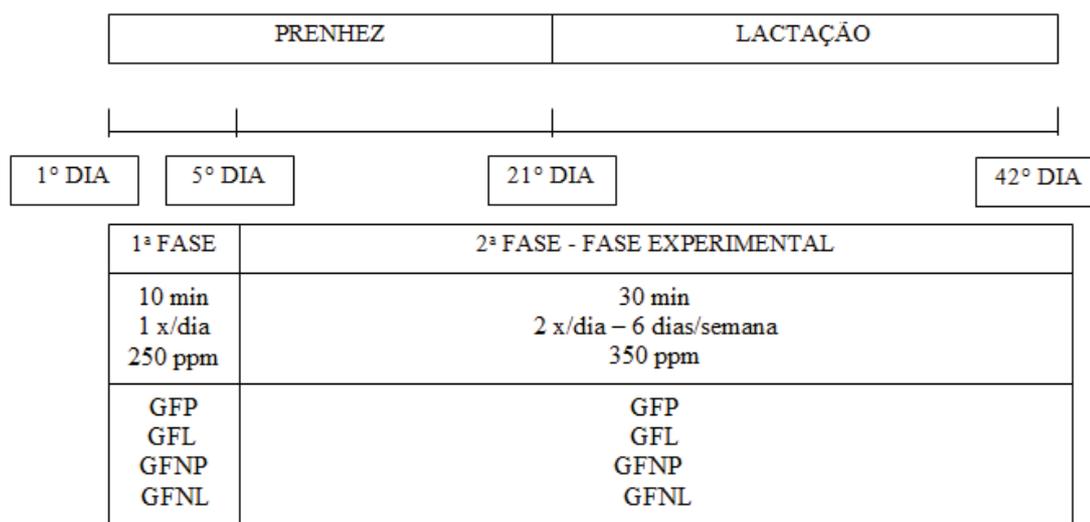


Figura 2 - Fluxograma com o protocolo de tabagismo passivo, ao qual foram expostos ratas prenhes e em lactação.

GFP: exposto à fumaça de cigarro na prenhez; GFL: exposto à fumaça de cigarro na prenhez e lactação; GFNP: exposto à fumaça de cigarro e natação na prenhez; GFNL exposto à fumaça de cigarro e natação na prenhez e lactação.

Para a realização deste protocolo foram utilizadas duas câmaras hermeticamente fechadas (Figura 3): uma para os grupos GFP, GFL, GFNP e GFNL, com inalação de fumaça de cigarro, e a segunda para os animais dos grupos GCP, GCL, GNP e GNL, com inalação somente de ar comprimido. A câmara para inalação de fumaça foi dividida em dois compartimentos: um para a colocação de cigarros acesos, e outro destinado à exposição da gaiola com seis animais (Figura 4), sendo adaptada segundo o modelo de inalação descrito por Cendon Filha ⁽⁵⁷⁾.



Figura 3 – Fotografia ilustrando a câmara de inalação de fumaça de cigarro ou ar comprimido, para exposição das ratas prenhes e em lactação.

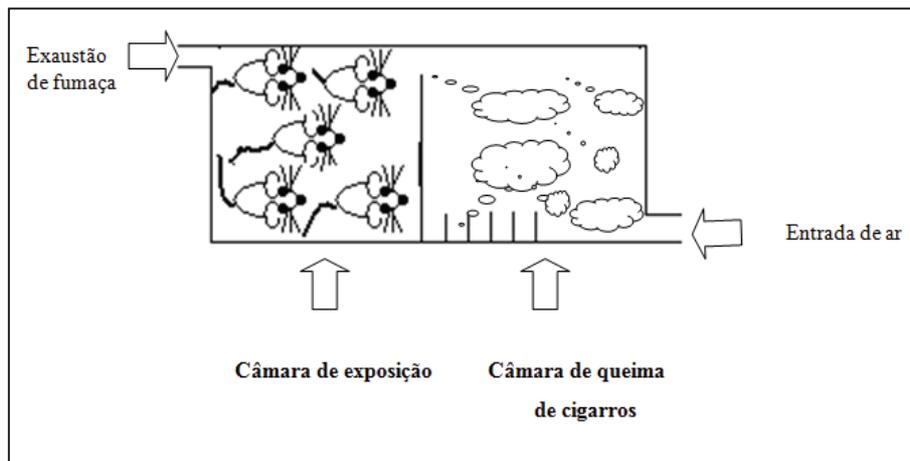


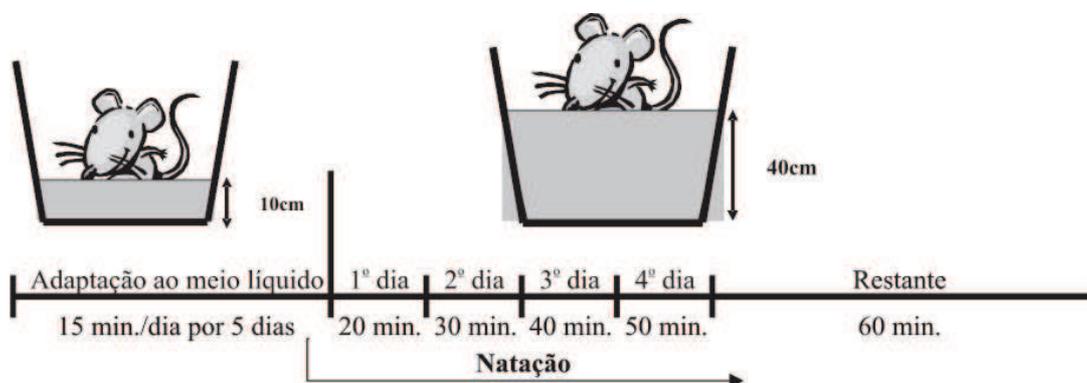
Figura 4 – Esquema de exposição à fumaça de cigarro ou ar comprimido, utilizado na experimentação com ratas prenhes e em lactação.

Foram utilizados cigarros adquiridos comercialmente, com a seguinte composição: mistura de fumos, açúcares, papel de cigarro, extratos vegetais e agentes de sabor, que produzem em cada queima: 10mg de alcatrão, 0,9mg de nicotina e 10mg de CO, conforme relatado na embalagem do produto.

2.5 Protocolo do Programa de Natação

A Figura 5 mostra o fluxograma utilizado no protocolo de natação. No primeiro dia de prenhez foi iniciado o programa de natação, como descrito por Volpato et al. ⁽⁵⁸⁾, em um tanque contendo água a 30°C, no nível de 40cm com o intuito de não permitir o apoio da calda das ratas no fundo do tanque, tendo assim o estímulo para nadar. Este programa foi dividido em duas fases: a primeira, fase de adaptação ao treinamento (Figura 6), caracterizada pelas cinco primeiras sessões de natação com aumento progressivo de 10 minutos de duração por dia, começando com 20 minutos e chegando à quinta sessão com 60 minutos. A segunda, fase de treinamento, foi iniciada na sexta

sessão mantendo-se o tempo de duração de 60 minutos até o final da prenhez ou lactação.



Fonte: Volpato et al., 2006 ⁽⁵⁸⁾.

Figura 5 - Fluxograma utilizado no protocolo de natação para ratas prenhes ou em lactação.



Figura 6 – Fotografia mostrando o ambiente utilizado na fase de adaptação ao treinamento de natação de ratas prenhes ou em lactação.

As sessões de natação foram diárias (Figura 7), sem interrupção, no período da manhã, por seis dias da semana durante três semanas para os animais prenhes não expostos a fumaça de cigarros (GNP) e para aqueles expostos (GFNP). Enquanto para os animais em lactação o protocolo teve duração de seis semanas, incluindo aqueles não submetidos à fumaça de cigarros (GNL) e os expostos à fumaça (GFNL). Os grupos GFNP e GFNL foram submetidos às sessões de natação logo após a exposição à fumaça de cigarros. Os animais que não participaram do protocolo de natação, incluindo o grupo com prenhez e aquele em lactação, ambos expostos à fumaça (GFP e GFL, respectivamente), assim como os grupos apenas com prenhez (GCP) e lactação (GCL), foram submetidos às mesmas condições do programa de natação, entretanto, com água a 10cm por 15 minutos, expostos, portanto, ao mesmo estresse do meio, mas evitando o treinamento físico por meio da natação. Após cada sessão do programa de natação os animais foram colocados em gaiolas e expostos a lâmpadas incandescentes em uma caixa de secagem (Figura 8).



Figura 7 – Fotografia ilustrando o ambiente utilizado no programa de natação de ratas prenhes ou em lactação.



Figura 8 – Fotografia mostrando a caixa para secagem de ratas prenhes ou em lactação, após cada sessão do protocolo de natação.

2.6 Obtenção das Amostras Biológicas

As 48 ratas foram pesadas antes da cópula e no dia da eutanásia, assim como as respectivas proles, ao nascimento e após o período como lactentes. No 21º dia de prenhez e no 21º dia de lactação as mães e filhotes foram eutanasiados mediante decapitação por guilhotina. Em seguida, foi iniciado o procedimento cirúrgico para a retirada do coração. Para a extração do tecido cardíaco, o tórax dos animais foi cuidadosamente aberto, preservando-se as estruturas.

O coração foi retirado e imediatamente pesado para avaliação dos parâmetros anatômicos e verificação de hipertrofia do miocárdio. Após este procedimento, foi injetado soro fisiológico, utilizando uma seringa, nas câmaras cardíacas por meio da veia cava superior e da artéria aorta. Em seguida, foi realizado um corte transversal ao

eixo maior do coração, obtendo-se os ventrículos direito e esquerdo, que foram fixados em formalina (10%).

2.7 Análise Morfológica

Após inclusão em parafina, os blocos contendo os fragmentos do tecido cardíaco foram cortados em micrótomo rotatório pelo método semi-seriado com espessura de 5 μ m. As lâminas foram coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE). As imagens dos cardiomiócitos foram capturadas no aumento de 40x, utilizando microscópio LEICA (modelo DM750, Alemanha) acoplado a câmera de vídeo. Mensurou-se a área de 50 células por ventrículo, sendo a captura em campos diferentes selecionados de acordo com a visualização do maior número de células em corte transversal ^(59,60).

O estudo cariométrico foi realizado a partir da medida dos diâmetros menor e maior dos núcleos dos cardiomiócitos, utilizando microscópio LEICA (modelo DM750, Alemanha) acoplado a câmera de vídeo, com aumento de 100x, em um campo aleatório das lâminas coradas com HE ⁽⁶¹⁾. Para cada animal foram consideradas 50 imagens nucleares dos cardiomiócitos. Foi realizada a avaliação dos parâmetros nucleares, considerando tamanho, volume e forma, assim como suas relações por meio dos diâmetros maior e menor: diâmetro médio, perímetro, relação diâmetro maior e menor, área, relação área e volume, coeficiente de forma, índice de contorno e excentricidade.

As fórmulas utilizadas para os cálculos desses parâmetros foram:

- Diâmetro médio: $M = (D \cdot d)^{1/2}$
- Perímetro: $P = (\pi/2) \times [1,5 \times (D+d) - M]$
- Relação entre diâmetro maior e diâmetro menor: D/d
- Volume: $V = \pi/6 \times M^3$

- Área: $\pi/4 \times M^2$
- Relação área/volume: $2/3 \times M$
- Coeficiente de forma: $F = 4 \times \pi \times A/P^2$
- Índice de contorno: $I = P/(A)^{1/2}$
- Excentricidade: $E = [(D + d)^{1/2} \times (D - d)^{1/2}] / D$

2.8 Dimensão Fractal

Para auxiliar na avaliação da morfologia dos núcleos de cardiomiócitos aplicou-se o cálculo da dimensão fractal, utilizado para uma estrutura não-homogênea e não-simétrica, o que caracteriza uma estrutura fractal ⁽⁵⁰⁾.

Para análise da dimensão fractal, as lâminas foram fotografadas, e as imagens submetidas à análise utilizando-se o software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) ^(62,63). As curvas para determinação da dimensão fractal foram geradas pelo método de *Box-Couting*, um dos métodos mais conhecidos e utilizados para estimar a dimensão fractal de uma forma ou imagem, pela sua simplicidade de implementação ⁽⁶⁴⁾. Esse método consiste em cobrir a imagem ou objeto a ser analisado com quadrados de lados L e contar o número de quadrados N (L) necessários para cobrir toda a forma (Figura 9).

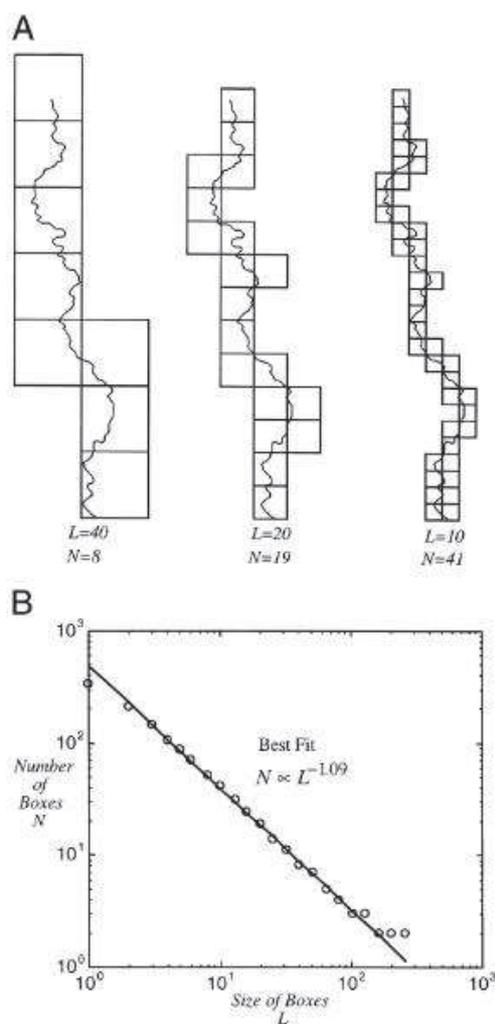


Figura 9 – A e B: representação do método de *Box-Counting*⁽⁶⁴⁾.

Quando este procedimento é aplicado em uma linha reta, espera-se um comportamento $N(L)$ proporcional a $1/L$; para uma superfície (plano), a relação passa a ser $N(L)$ proporcional a $1/L^2$ enquanto que uma forma espacial (volume) apresenta relação descrita por $N(L)$ proporcional a $1/L^3$. Para formas mais complexas, ela toma a

forma de uma relação do tipo $N(L) = \frac{1}{L^d}$, uma lei de potência, com d sendo a dimensão.

Desenvolvendo esta relação com a ajuda de logaritmos, chega-se à seguinte equação, onde d é determinado mediante construção de um gráfico log-log:

$$\log[N(L)] = \log(1) - d \cdot \log(L)$$

As imagens foram binarizadas, com tons de cinza variando entre 0 (preto) e 255 (branco) e o contorno fractal (outline) feito para as partes escuras da imagem, cobertas com caixas quadradas de dimensões de 2 a 64 pixels⁽⁶⁴⁾.

2.9 Análise Estatística

Foram apresentados valores de média, e respectivos desvios padrão, ou mediana e intervalos de confiança de 95%. Para análise da normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk, quando confirmada prosseguiu-se com o teste de variância (ANOVA - One Way) e pós-teste de Tukey, caso contrário, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. O teste t pareado foi utilizado para comparação dos valores de peso inicial e final dos animais. Para todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5%. Utilizou-se para as análises o programa GraphPad Prism® versão 7.0.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Peso Corporal e do Coração

Houve semelhança no peso corporal das ratas virgens antes da cópula em todos os grupos ($P = 0,734$), assim como após o período de prenhez ($P=0,802$) (Figura 10A). Entretanto, após o período de lactação o grupo submetido à natação (GNL) mostrou aumento de peso corporal, comparado àqueles no protocolo de natação e expostos também à fumaça de cigarros (GFNL; $P=0,026$; Figura 10B).

Com relação ao peso do coração houve semelhança entre os grupos após prenhez ($P=0,990$), assim como após lactação ($P=0,924$) (Figuras 10C e 10D). O mesmo ocorreu para a razão entre peso do coração e peso corporal ($P=0,976$ e $P=0,467$; Figuras 10E e 10F, respectivamente).

Em relação aos filhotes, a prole do grupo de mães expostas à fumaça e à natação (GFNP) mostrou redução no peso corporal ($22,547\pm 4,68\text{g}$), comparado à prole de mães expostas à fumaça (GFP: prole= $26,452\pm 4,59\text{g}$; $P=0,003$) e ao grupo sem exposição e não inserido no programa de natação (GCP: prole= $34,47\pm 7,81\text{g}$; $P=0,001$) (Figura 11A). A prole de GFNP apresentou também valores reduzidos no peso do músculo cardíaco ($0,157\pm 0,027\text{g}$), comparado aos filhotes do grupo de mães submetidas à natação (GNP: prole = $0,251\pm 0,033\text{g}$; $P=0,004$; Figura 11B). A razão entre o peso do coração e o peso corporal dos filhotes foi semelhante entre os grupos (Figura 11C).

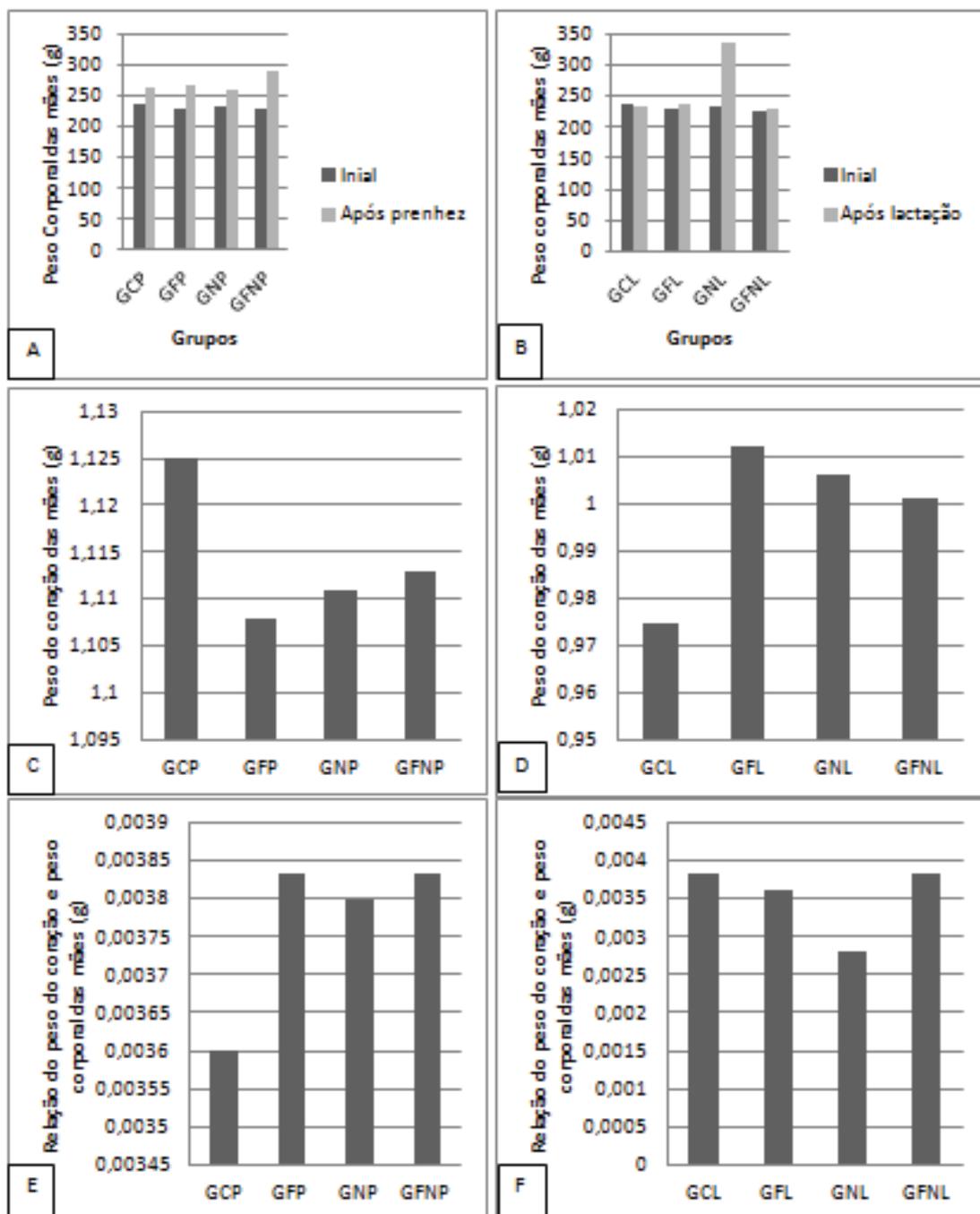


Figura 10 - Medidas de ratas prenhes expostas ou não à fumaça de cigarros e submetidas ou não a protocolo de natação. Peso Corporal (A e B). Peso do coração (C e D). Relação peso do coração/peso corporal (E e F). GFP - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GNP - submetido ao programa de natação durante a prenhez; GCP – controle mantido sem exposição à fumaça de cigarro e sedentário durante a prenhez. GFL - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez e lactação; GFNL - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez e lactação; GNL - submetido ao programa de natação durante a prenhez e lactação; GCL – controle mantido sem exposição à fumaça de

cigarro e sedentário durante a prenhez e lactação. * Diferença significativa entre GNL e GFNL no peso corporal das mães. $P = 0,026$.

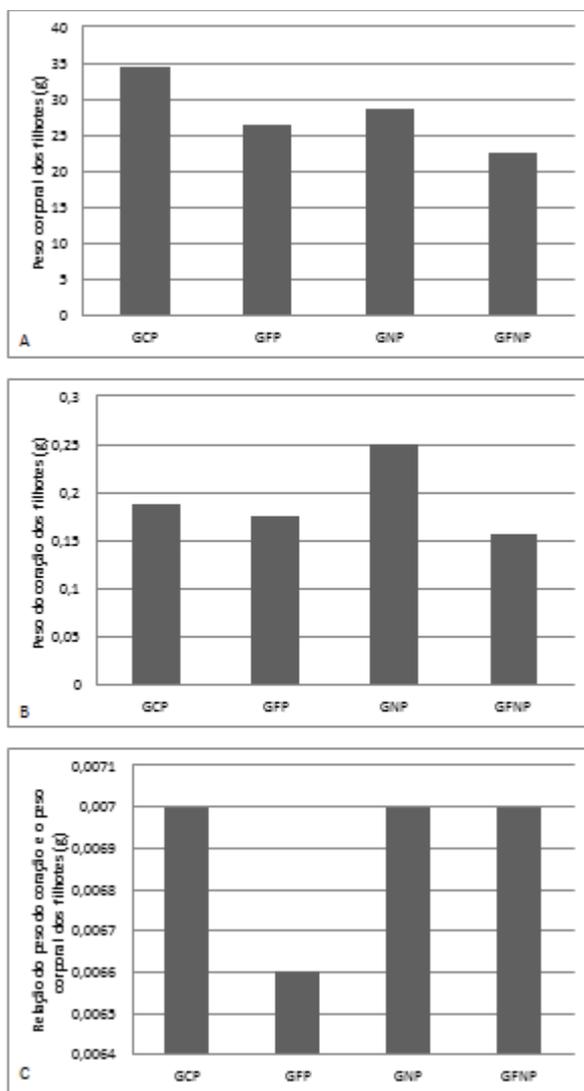


Figura 11 – Medidas da prole de ratas prenhes expostas ou não à fumaça de cigarros e submetidas ou não a protocolo de natação. Peso corporal (A), Peso do coração (B) e Relação peso do coração/peso corporal (C). GFP - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP – submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GNP– submetido ao programa de natação durante a prenhez; GCP– controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante a prenhez. *Diferença significativa no peso do coração dos filhotes entre GFNP e GNP ($P = 0,004$) e no peso corporal dos filhotes entre GFNP e GFP ($P = 0,003$) e entre GFNP e GCP ($P = 0,001$).

3.2 Morfometria

Houve aumento da área de cardiomiócitos no grupo de mães prenhes expostas a fumaça de cigarros e submetidas ao protocolo de natação (GFNP: mediana=267,74 μm^2), comparado ao grupo com prenhez (GCP=252,97 μm^2 ; P=0,044) e com aquelas prenhes e submetidas apenas ao programa de natação (GNP=251,48 μm^2 ; P=0,022; Tabela 1). Já, nos grupos em lactação destacou-se aquele submetido à natação (GNL), com valores aumentados da área de cardiomiócitos (mediana=290,08 μm^2), comparado ao grupo no programa de natação e tabagismo passivo (GFNL=241,96 μm^2 ; P<0,0001), assim como aquele exposto apenas ao tabagismo passivo (GFL=223,89 μm^2 ; P<0,0001) e ao grupo apenas em lactação (GCL=213,47 μm^2 ; P<0,0001), cujos valores mostraram-se reduzidos também em relação ao grupo GFNL (P=0,001) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Valores de mediana, mínimo e máximo da área de cardiomiócitos após prenhez em ratas submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.

Grupo	Área (μm^2)		
	Mediana	Mínimo	Máximo
GCP	252,97●	250,33	276,16
GFP	251,54	257,96	278,57
GNP	251,48■	246,92	268,96
GFNP	267,74●■	278,19	301,03

GFP - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GNP – submetido ao programa de natação durante a prenhez; GCP – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante a prenhez.

● = GCP x GFNP: P = 0,044; ■ = GFNP x GNP: P = 0,022.

Tabela 2 - Valores de mediana, mínimo e máximo da área dos Cardiomiócitos, após lactação em ratas submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.

Grupo	Área (μm^2)		
	Mediana	Mínimo	Máximo
GCL	213,469●■	218,45	237,33
GFL	223,89◆	225,10	244,51
GNL	290,08■◆○	295,88	323,43
GFNL	241,96●○	240,28	257,31

GFL - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez e lactação; GFNL – submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez e lactação; GNL - submetido ao programa de natação durante a prenhez e lactação; GCL – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante a prenhez e lactação.

● = GCL x GFNL: P = 0,001; ■ = GCL x GNL: P = 0,000; ◆ = GFL x GNL: P = 0,000; ○ = GFNL x GNL: P = 0,000.

A análise cariométrica mostrou valores semelhantes entre todos os grupos de ratas prenhes ou em lactação, respectivamente, submetidas ou não a natação e ao protocolo de tabagismo passivo (Tabelas 3 a 11), em relação a perímetro (P = 0,716; P=0,724), coeficiente de forma (P = 0,593; P = 0,335), índice de contorno (P = 0,421; P = 0,375), diâmetro médio (P = 0,436; P = 0,124), relação diâmetro maior e menor (P = 0,405; P = 0,374), relação volume e área (P = 0,190; P = 0,079), excentricidade (P = 0,167; P = 0,261), volume (P = 0,165; P=0,960) e área (P = 0,994; P = 0,109).

Tabela 3 - Valores de mediana, mínimo e máximo do perímetro do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.

Grupo	Mediana (μm)	Mínimo (μm)	Máximo (μm)
GCP	21,83	19,63	24,71
GFP	22,68	20,96	26,51
GNP	20,98	18,29	23,99
GFNP	25,84	21,49	28,83
GCL	23,00	20,89	25,34
GFL	22,01	20,56	25,02
GNL	22,85	16,88	27,26
GFNL	23,17	21,17	26,44

GFP – exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez; GNP – submetido ao programa de natação durante prenhez; GCP – controle Não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez. GFL - exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GFNL - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GNL - submetido ao programa de natação durante prenhez e lactação; GCL – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez e lactação. Valor- $P > 0,05$ para todas as comparações.

Tabela 4 - Valores de mediana, mínimo e máximo do diâmetro médio do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.

Grupo	Mediana (μm)	Mínimo (μm)	Máximo (μm)
GCP	5,35	4,84	5,99
GFP	5,56	5,11	5,88
GNP	5,40	4,77	6,02
GFNP	6,22	5,49	6,62
GCL	5,84	5,49	6,10
GFL	5,6	5,15	6,01
GNL	5,6	4,27	7,00
GFNL	6,15	5,82	6,50

GFP - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez; GNP – submetido ao programa de natação durante prenhez; GCP – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez. GFL – exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GFNL – submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GNL – submetido ao programa de natação durante prenhez e lactação; GCL – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez e lactação. Valor-P>0,05 para todas as comparações.

Tabela 5 - Valores de mediana, mínimo e máximo do diâmetro maior e menor do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhez e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.

Grupo	Mediana (μm)	Mínimo (μm)	Máximo (μm)
GCP	3,55	2,97	3,98
GFP	4,06	3,17	4,86
GNP	3,14	2,54	3,59
GFNP	3,62	2,84	4,42
GCL	3,04	2,57	3,91
GFL	3,62	3,09	3,88
GNL	3,03	2,58	3,58
GFNL	2,83	2,40	3,54

GFP - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez; GNP – submetido ao programa de natação durante prenhez; GCP – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez. GFL – exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GFNL – submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GNL – submetido ao programa de natação durante prenhez e lactação; GCL – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez e lactação. Valor-P>0,05 para todas as comparações.

Tabela 6 - Valores de mediana, mínimo e máximo do volume do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.

Grupo	Mediana (μm)	Mínimo (μm)	Máximo (μm)
GCP	86,89	60,41	127,83
GFP	97,12	72,47	122,35
GNP	89,79	59,47	123,24
GFNP	142,17	95,49	168,12
GCL	120,37	98,63	134,16
GFL	103,38	79,82	127,30
GNL	109,04	29,22	184,99
GFNL	135,40	113,95	161,74

GFP - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez; GNP – submetido ao programa de natação durante prenhez; GCP – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez. GFL – exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GFNL – submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GNL – submetido ao programa de natação durante prenhez e lactação; GCL – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez e lactação. Valor-P>0,05 para todas as comparações.

Tabela 7 - Valores de mediana, mínimo e máximo da área do núcleo de cardiomiócito em ratas prenhez e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.

Grupo	Mediana (μm^2)	Mínimo (μm^2)	Máximo (μm^2)
GCP	23,11	18,61	29,42
GFP	24,89	20,82	28,53
GNP	23,55	18,20	29,16
GFNP	31,66	24,51	35,58
GCL	28,16	24,72	30,41
GFL	25,64	21,65	29,49
GNL	26,47	13,42	38,76
GFNL	30,79	27,52	34,50

GFP - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez; GNP – submetido ao programa de natação durante prenhez; GCP – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez. GFL – exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GFNL – submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GNL – submetido ao programa de natação durante prenhez e lactação; GCL – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez e lactação. Valor-P>0,05 para todas as comparações.

Tabela 8 - Valores de mediana, mínimo e máximo da relação volume e área do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.

Grupo	Mediana (μm)	Mínimo (μm)	Máximo (μm)
GCP	3,56	3,22	3,99
GFP	3,70	3,41	3,93
GNP	3,60	3,18	4,01
GFNP	4,14	3,66	4,41
GCL	3,89	3,66	4,06
GFL	3,73	3,43	4,01
GNL	3,79	2,85	4,67
GFNL	4,10	3,88	4,33

GFP - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez; GNP – submetido ao programa de natação durante prenhez; GCP – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez. GFL – exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GFNL – submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GNL – submetido ao programa de natação durante prenhez e lactação; GCL – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez e lactação. Valor-P>0,05 para todas as comparações.

Tabela 9 - Valores de mediana, mínimo e máximo de forma do núcleo do cardiomiócito em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.

Grupo	Mediana (μm)	Mínimo (μm)	Máximo (μm)
GCP	0,615	0,553	0,686
GFP	0,563	0,478	0,657
GNP	0,665	0,602	0,756
GFNP	0,599	0,503	0,698
GCL	0,673	0,562	0,735
GFL	0,595	0,562	0,667
GNL	0,679	0,623	0,721
GFNL	0,702	0,607	0,762

GFP - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez; GNP – submetido ao programa de natação durante prenhez; GCP – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez. GFL – exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GFNL – submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GNL – submetido ao programa de natação durante prenhez e lactação; GCL – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez e lactação. Valor-P>0,05 para todas as comparações.

Tabela 10 - Valores de mediana, mínimo e máximo do índice de contorno do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.

Grupo	Mediana (μm)	Mínimo (μm)	Máximo (μm)
GCP	4,63	4,35	4,84
GFP	4,87	4,45	5,26
GNP	4,44	4,14	4,65
GFNP	4,67	4,29	5,06
GCL	4,38	4,15	4,81
GFL	4,67	4,41	4,80
GNL	4,38	4,16	4,64
GFNL	4,28	4,06	4,63

GFP - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez; GNP – submetido ao programa de natação durante prenhez; GCP – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez. GFL – exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GFNL – submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GNL – submetido ao programa de natação durante prenhez e lactação; GCL – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez e lactação. Valor-P>0,05 para todas as comparações.

Tabela 11 - Valores de mediana, mínimo e máximo da excentricidade do núcleo de cardiomiócitos em ratas prenhes e, após lactação, submetidas ou não a programa de natação, com ou sem exposição ao protocolo de tabagismo passivo.

Grupo	Mediana (μm)	Mínimo (μm)	Máximo (μm)
GCP	0,945	0,919	0,963
GFP	0,955	0,927	0,975
GNP	0,920	0,872	0,957
GFNP	0,945	0,918	0,971
GCL	0,927	0,908	0,957
GFL	0,951	0,929	0,956
GNL	0,926	0,906	0,944
GFNL	0,918	0,897	0,946

GFP - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez; GNP – submetido ao programa de natação durante prenhez; GCP – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez. GFL – exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GFNL – submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante prenhez e lactação; GNL – submetido ao programa de natação durante prenhez e lactação; GCL – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante prenhez e lactação. Valor-P>0,05 para todas as comparações.

3.3 Dimensão Fractal

A análise da dimensão fractal não apresentou diferença significativa em relação às medidas de cardiomiócitos e respectivos núcleos entre os grupos prenhes (P=0,198; Figura 12), assim como também naqueles em lactação (P=0,972; Figura 13).

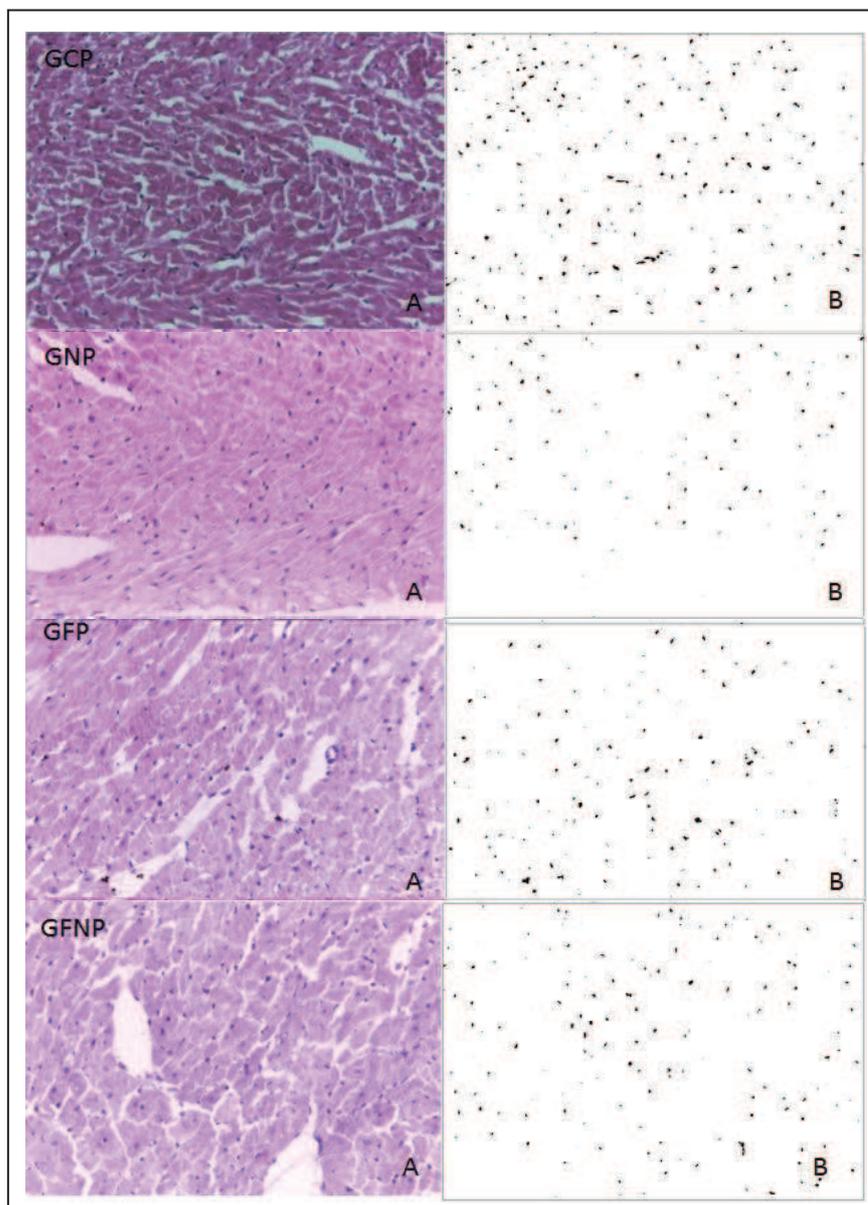


Figura 12 – A: Fotomicrografia de corte histológico de miocárdio de ratas prenhez corado com hematoxilina-eosina (aumento de 40x); B – Processo de binarização, em que os núcleos são pretos e o restante da célula apresenta-se branco. GFP - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GFNP - submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez; GNP – submetido ao programa de natação durante a prenhez; GCP – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante a prenhez.

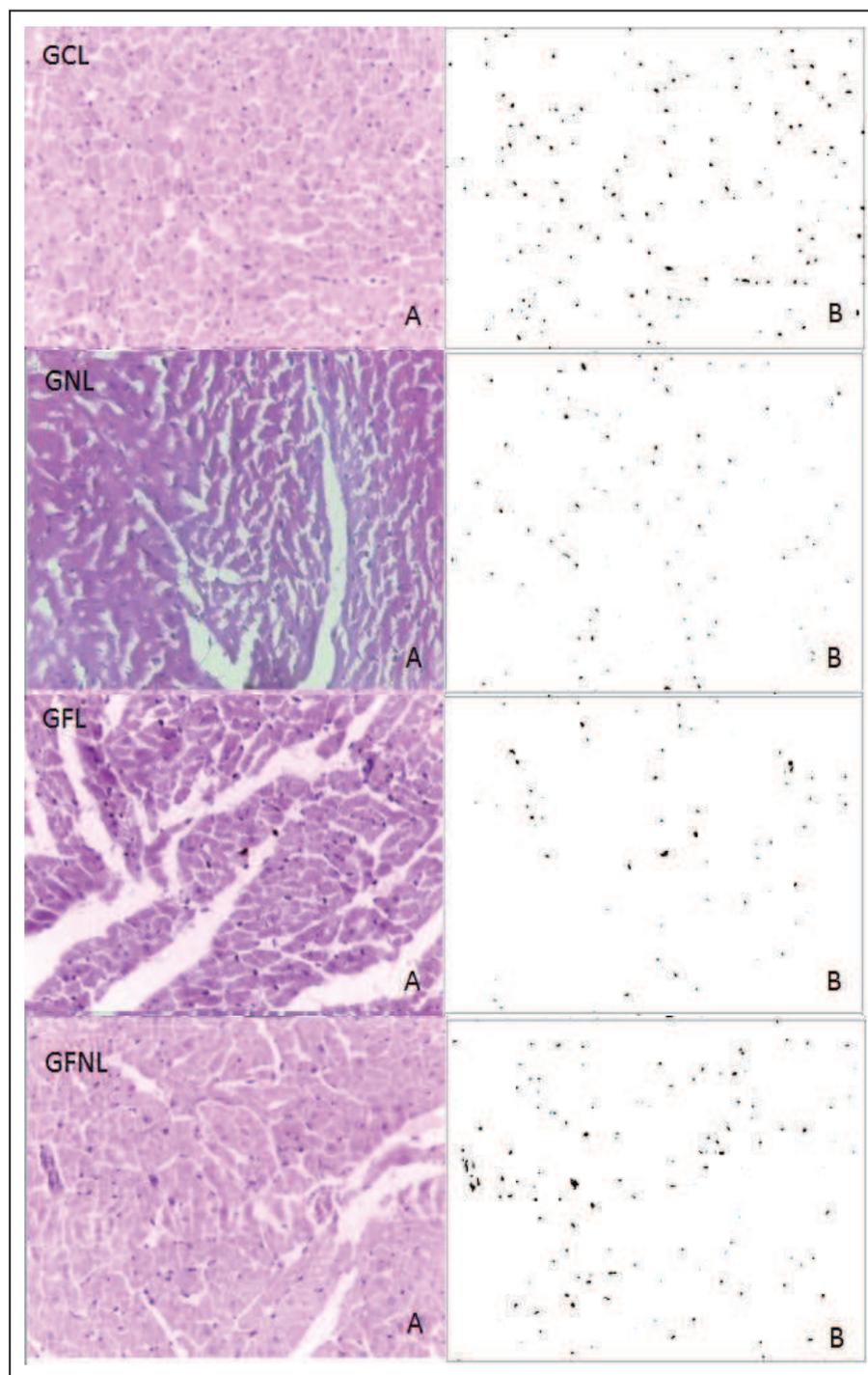


Figura 13 - A – Fotomicrografia de corte histológico do miocárdio de ratas em lactação corado com hematoxilina-eosina (aumento de 40x); B – Processo de binarização, em que os núcleos são pretos e o restante da célula apresenta-se em branco. GFL - exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez e lactação; GFNL – submetido ao programa de natação e exposto à fumaça de cigarro durante a prenhez e lactação; GNL – submetido ao programa de natação durante a prenhez e lactação; GCL – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário durante a prenhez e lactação.

As Figuras 14 e 15 apresentam a correlação entre $\log(\text{count})$ e $\log(\text{Box size})$ para os grupos de ratas prenhes e em lactação, respectivamente, sem significância em ambos os grupos.

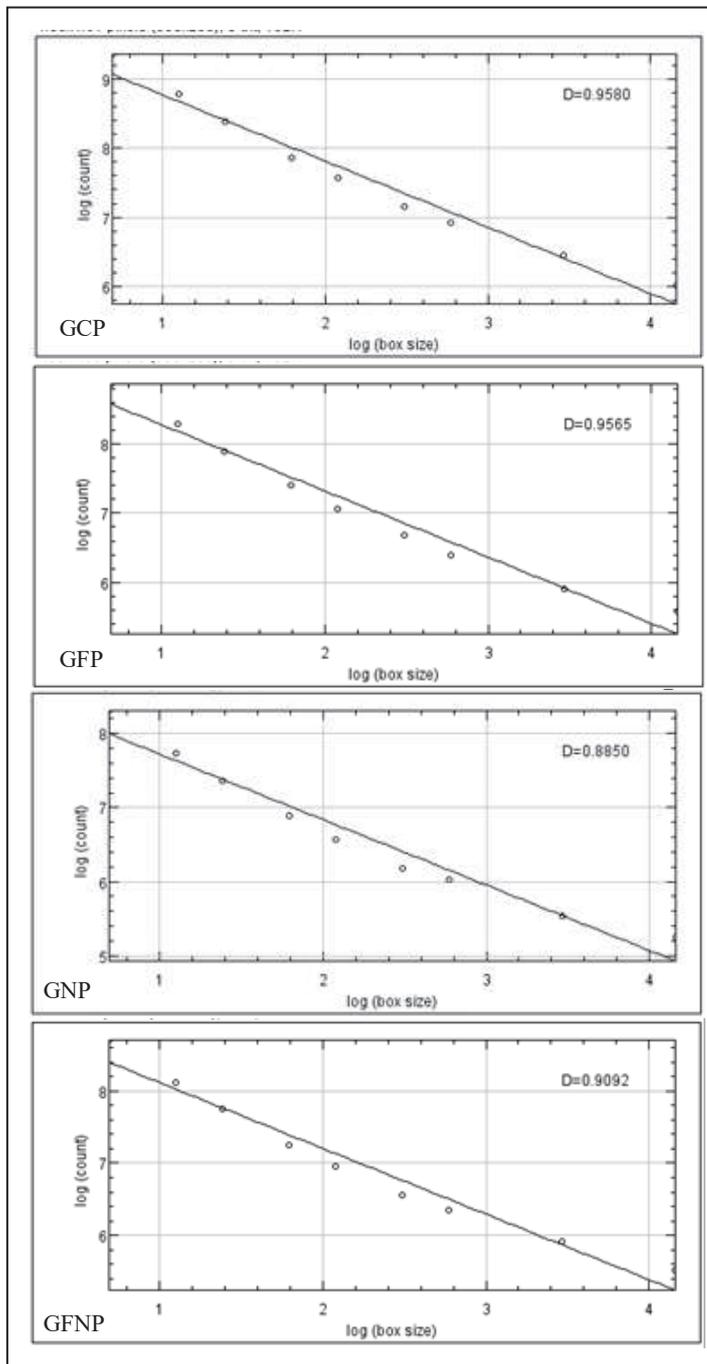


Figura 14 – Regressão linear considerando quantidade e tamanho da caixa em grupos de ratas prenhes: GCP – controle não exposto à fumaça de cigarros e sedentário; GFP - exposto à fumaça de cigarros; GNP – submetido ao programa de natação; GFNP - submetido à fumaça de cigarros e ao programa de natação.

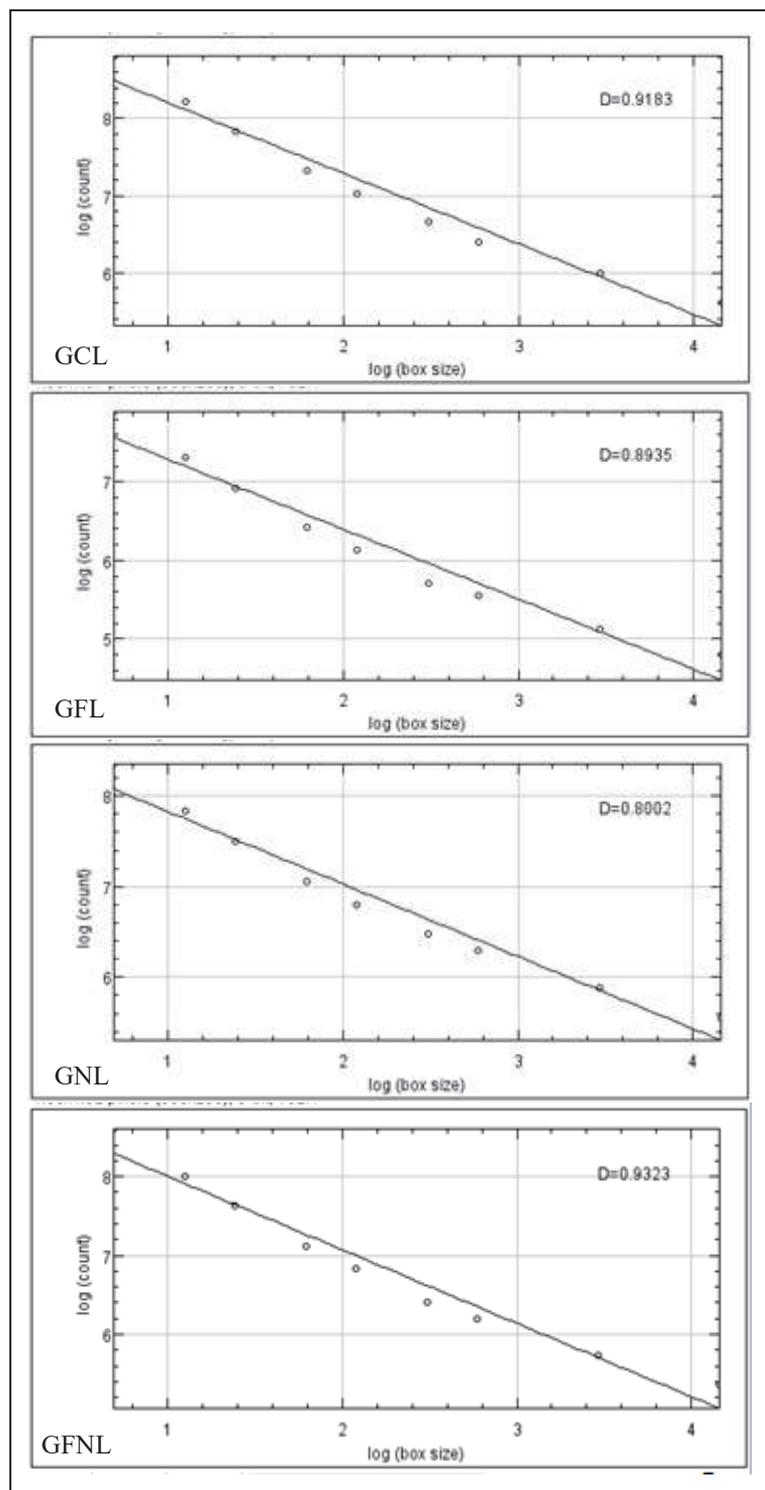


Figura 15 – Regressão linear, considerando quantidade e tamanho da caixa em grupos de ratos prenhes e em lactação: GCL – controle não exposto à fumaça de cigarro e sedentário; GFL – exposto à fumaça de cigarros em ambos os períodos; GNL – submetido ao programa de natação; GFNL – exposto à fumaça de cigarros e submetido ao programa de natação.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

O presente estudo evidencia o impacto do tabagismo passivo e do exercício físico por meio da natação durante prenhez e lactação, no miocárdio em ratas e sua prole. Há referência das consequências do tabagismo passivo para o feto e recém-nascido, resultando em efeitos negativos graves a curto e longo prazo, com aumento de morbidade e mortalidade ^(54,65-67). Entretanto, pouco se sabe sobre sua influência na morfometria cardíaca durante prenhez e lactação.

Neste estudo foi utilizado o modelo experimental, que vem sendo amplamente aplicado para retratar a exposição ao tabagismo ^(13,15,26,53-55,57), assim como o exercício físico ^(51,52,58,60). Foi selecionado o tabagismo passivo, visto que muitas mulheres tendem a cessar o tabagismo ativo durante a gestação ⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾, e o exercício físico por meio da natação, por ser recomendado para gestantes pelos benefícios do meio líquido ^(48,51,58).

Com relação ao peso corporal das ratas, observou-se que após o período de lactação o grupo que apenas realizou o programa de natação (GNL) apresentou peso maior, comparado àquele que além do exercício físico foi exposto também à fumaça de cigarro (GFNL). Isso pode ser explicado pelo efeito inibidor de apetite provocado pela nicotina contida no cigarro ⁽⁷¹⁾. Além disso, com o exercício físico há aumento de gasto energético, que é potencializado no período de lactação ⁽⁷²⁾. Segundo Moriel et al., ⁽⁷³⁾ os indivíduos fumantes podem apresentar diferenças na qualidade e quantidade dos alimentos ingeridos, ação inibidora do apetite causada pela nicotina, aumento da taxa metabólica, com maior gasto de energia pelos fumantes, gerando mudança no humor.

Em relação aos filhotes, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro na gestação, foi verificado baixo peso ao nascer. Estudo em casuística polonesa,

considerando mulheres em período perinatal distribuídas em fumantes ativas, fumantes passivas e não expostas ao tabaco, mostrou hipotrofia fetal para mulheres expostas a componentes do tabaco durante a gravidez ⁽⁷⁴⁾. No entanto, Ko et al. ⁽⁷⁵⁾ não detectaram relação significativa de baixo peso ao nascer e idade gestacional com diferentes níveis de tabagismo paterno, o que torna esse assunto polêmico, necessitando ainda esclarecimento.

Por outro lado, vários estudos ⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾ demonstram que tabagismo materno na gravidez pode diminuir o peso ao nascer e aumentar significativamente o risco de parto prematuro. O tabagismo durante a gravidez aumenta o risco de isquemia fetal, o que pode ter influenciado no baixo peso ao nascer e peso do coração menor nos grupos ora estudados, expostos à fumaça de cigarro. Outro fator que contribui para o baixo peso fetal é a hipóxia, pelo fato do CO contido no tabaco, ter grande afinidade com a hemoglobina e, conseqüentemente, aumentar os níveis de carboxihemoglobina nas artérias umbilicais, inibindo o oxigênio celular ⁽⁷⁸⁾.

A nicotina também age no organismo materno liberando catecolaminas causando, conseqüentemente, taquicardia, vasoconstrição periférica e redução da perfusão sanguínea uterina ⁽⁷⁸⁾. Esta condição resulta em nutrição e oxigenação fetal deficientes, o que sugere ser a causa do baixo peso ao nascer e peso do coração observado no presente estudo.

O tabagismo quando associado ao exercício mostrou redução no peso corporal e do músculo cardíaco da prole, o que é justificado pela soma de estresse materno ⁽¹³⁾. O exercício físico influencia no peso corporal durante a gestação, por controlar o índice glicêmico ⁽⁷⁹⁾ e melhorar o metabolismo lipídico ⁽⁵⁸⁾. Entretanto, duração, tipo e período

de aplicação do exercício físico são fatores que podem interferir no desenvolvimento fetal ⁽⁵¹⁾.

Com relação à morfometria, houve aumento da área dos cardiomiócitos nos grupos que realizaram exercício físico. O aumento da carga mecânica no coração é a causa da hipertrofia cardíaca, seja pelo desenvolvimento cardíaco, exercício físico, gravidez, elevação da pressão arterial ou insuficiência cardíaca. Sabe-se que a hipertrofia cardíaca é um mecanismo de compensação frente à sobrecarga hemodinâmica, seja pressórica ou volumétrica, mantendo o desempenho contrátil do coração. Nesse caso, o processo dinâmico de adição sarcomérica é o principal evento molecular que ocorre durante a hipertrofia, seja fisiológica ou patológica ⁽⁸⁰⁾.

O peso do coração e a razão entre peso corporal têm sido utilizados também para caracterizar hipertrofia cardíaca ⁽⁶²⁾. No entanto, no presente estudo o peso anatômico do coração das mães foi mantido em ambos os grupos, provavelmente pelo pouco tempo de exercício físico realizado, sendo de 21 dias para a prenhez e 42 dias incluindo o período de lactação.

A cariometria, mensurando o diâmetro dos núcleos dos cardiomiócitos, não mostrou diferença entre os grupos já em estado de prenhez, assim como em lactação. A cariometria mostra a atividade do núcleo, cuja fase ativa corresponde a intenso metabolismo celular. Liberatori Filho ⁽⁶¹⁾ et al. verificaram maior atividade metabólica das células cardíacas durante 14º e 21º dia de prenhez, relacionada à sobrecarga volumétrica, importante na manutenção da gestação. No entanto, no presente estudo, a análise foi realizada apenas ao nascimento da prole, sem comparação antes da gestação e diferentes períodos de prenhez.

Além disso, assim como no estudo de Padulla et al. ⁽⁶⁰⁾, é possível que o exercício físico não promoveu alteração no núcleo de cardiomiócitos, devido à intensidade de esforço utilizada. No caso do referido estudo, o exercício foi realizado por 60 minutos em cinco dias da semana por oito semanas, com velocidade de 9,75 metros por minuto totalizando 585 metros em uma sessão.

A análise da dimensão fractal não apresentou diferença significativa entre os grupos prenhez, assim como também naqueles em lactação. A dimensão fractal é considerada um método eficaz para avaliar alterações morfológicas cardíacas induzidas pela disfunção ventricular ⁽⁶²⁾. Inúmeros estudos ^(49,50,62,63,81,82) utilizaram a dimensão fractal como uma ferramenta de diagnóstico, aplicando o *Boxplot Counting* (método de contagem de caixas). Entretanto, é inédito o emprego deste método na mensuração dos cardiomiócitos em estado de prenhez e lactação, apesar de haver estudos mensurando cardiomiócitos em disfunção cardíaca induzida por hipertensão pulmonar ⁽⁴⁹⁾, cardioplegia ⁽⁸¹⁾ e cardiomiopatia hipertrófica ⁽⁸²⁾.

Portanto, neste estudo, destaca-se hipertrofia cardíaca observada pela análise morfométrica de cardiomiócitos mensurando-se sua área, não sendo verificada pela cariometria, que avalia o comportamento do núcleo do cardiomiócito, nem pela análise da dimensão fractal. Tem-se no presente estudo tanto a sobrecarga volumétrica imposta pela gestação, conforme verificado por Conq et al. ⁽⁸³⁾, quanto pelo exercício ⁽⁸⁴⁾. Sendo importante salientar que estudo ⁽⁸⁵⁾ recente, em modelo animal, sugere que o risco de doença cardíaca congênita é minimizado pelo exercício físico. Por outro lado, o risco de defeitos cardíacos congênitos no feto mostrou-se parcialmente associado à exposição ao tabagismo materno no início da gravidez ⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾.

O exercício físico agiu como protetor em condições de colite ulcerosa expostas ao tabagismo passivo ⁽⁸⁹⁾. Entretanto, no presente estudo, exercício físico, por meio da natação realizada no período de prenhez e lactação, combinado com tabagismo passivo associou-se a menor peso corporal, assim como na prole e seu respectivo peso do coração. Por outro lado, o programa de natação mostrou relação com hipertrofia do músculo cardíaco na lactação, assim como na prenhez, mesmo na presença do tabagismo passivo, um mecanismo de compensação frente à sobrecarga hemodinâmica, mantendo o desempenho contrátil do coração.

Como limitação do estudo, destaca-se a necessidade de avaliação do peso corporal das ratas durante o período entre prenhez e lactação, pois a partir destes dados poderia ser inferida a proporção de sobrecarga imposta pela prenhez. Sugere-se em novos estudos avaliar também o estresse oxidativo, tendo em vista o efeito dos componentes do tabaco na produção de espécies reativas de oxigênio ⁽⁹⁰⁾.

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Este estudo permite as seguintes conclusões.

1. Tabagismo passivo combinado à natação em período de prenhez e lactação influencia a redução de peso corporal em ratas (GFNL), sugerindo potencialização do efeito da nicotina, tendo em vista maior tempo de exposição desse grupo, além de estresse ao exercício físico, cujos efeitos acometem também a prole com redução do peso corporal e do coração.

2. A prática de natação nos períodos de prenhez e lactação influencia o aumento de cardiomiócitos em ratas e, conseqüentemente, hipertrofia do músculo cardíaco, sugerindo seu benefício na manutenção do desempenho contrátil do coração, mesmo diante do tabagismo passivo já durante a prenhez.

3. A mensuração da dimensão fractal, complementar a análise cariométrica, de caráter inédito neste estudo, apresenta semelhança entre os grupos, no entanto, torna-se necessário analisar comparativamente diferentes períodos, antes e durante a prenhez, visando caracterizar os diferentes momentos metabólicos dos cardiomiócitos nos diversos grupos propostos.

6. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

1. Banderali G, Martelli A, Landi M, et al. Short and long term health effects of parental tobacco smoking during pregnancy and lactation: a descriptive review. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13:327.
2. Jousilahti P, Patja K, Salomaa V. Environmental tobacco smoke and the risk of cardiovascular disease. *Scand J Work Environ Health*. 2002; 28 suppl 2:41–51.
3. Bottcher M, Falk E. Pathology of the coronary arteries in smokers and non-smokers. *J Cardiovasc Risk*. 1999; 6(5):299–302.
4. Minicucci MF, Azevedo PS, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiovascular remodeling induced by passive smoking. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009; 8(5):334-9.
5. Thomas J, Chan L, Wray A, Miller J, Mehta K, Yaxley A, Miller M. Does the presence of cardiovascular disease risk factors or established disease influence the dietary intake of affected adults and their children residing in the same household? A secondary analysis of the Australian Health Survey (2011–2013). *BMC cardiovascular disorders*. 2017; 17(1):146-157.
6. Osler M, Lund R, Kriegbaum M, Andersen AM. The influence of birth weight and body mass in early adulthood on early coronary heart disease risk among Danish men born in 1953. *Eur J Epidemiol*. 2009;24(1):57–61.
7. Ghasemi A, Zahediasl S, Azizi F. Nitric oxide and clustering of metabolic syndrome components in pediatrics. *Eur J Epidemiol*. 2010;25(1):45–53.
8. Whincup PH, Kaye SJ, Owen CG, Huxley R, Cook DG, Anazawa S, et al. Birth weight and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *JAMA*. 2008;300(24):2886–97.

9. White SL, Perkovic V, Cass A, Chang CL, Poulter NR, Spector T, et al. Is low birth weight an antecedent of CKD in later life? A systematic review of observational studies. *Am J Kidney*. 2009;54(2):248–61.
10. Kramer MS. Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis. *Bull WHO*. 1987;65:663–737.
11. Bakker H, Jaddoe VWV. Cardiovascular and metabolic influences of fetal smoke exposure. *European Journal of Epidemiology*. 2011;26(10):763-770.
12. Galão AO, Soder AS, Gerhardt M, Faertes TH, Krüger MS, Pereira DF, et al. Efeitos do fumo materno durante a gestação e complicações perinatais. *Rev HCPA & Fac Med Univ Fed Rio Gd do Sul* 2009; 29:218-24.
13. Valsoni BC, et al. Influence of passive smoking associated with exercise performed by rats during pregnancy and lactation on their offspring growth. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2011; 33(7):150-7.
14. Nakamura UM, Alexandre SM, Santos JFK, Souza E, Sass N, Beck APA, Trayna E, Andrade CMA, Barroso T, Junior LK. Obstetric and perinatal effects of active and/or passive smoking during pregnancy. *Rev Paul Med*. 2004; 122(3):94-8.
15. Zeskind PS, Gingras JL. Maternal cigarette-smoking during pregnancy disrupts rhythms in fetal heart rate. *J Pediatr Psychol*. 2006;31:5–14.
16. Geerts CC, Grobbee DE, van der Ent CK, de Jong BM, van der Zalm MM, van Putte-Katier N, Kimpfen JL, Uiterwaal CS. Tobacco smoke exposure of pregnant mothers and blood pressure in their newborns: results from the wheezing illnesses study Leidsche Rijn birth cohort. *Hypertension*. 2007;50:572–8.

17. Oken E, Huh SY, Taveras EM, Rich-Edwards JW, Gillman MW. Associations of maternal prenatal smoking with child adiposity and blood pressure. *Obes Res.* 2005;13:2021–8.
18. Bruin JE, Gerstein HC, Holloway AC. Long-term consequences of fetal and neonatal nicotine exposure: a critical review. *Toxicol Sci.* 2010;116:364–74.
19. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008; 371: 75–84.
20. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet.* 2012; 379: 2162–2172.
21. Meeker JD, Benedict MD Infertility, Pregnancy Loss and Adverse Birth Outcomes in Relation to Maternal Secondhand Tobacco Smoke Exposure. *Curr Womens Health Rev.* 2013; 9: 41–49.
22. Qiu J, He X, Cui H, Zhang C, Zhang H, Dang Y, et al. Passive smoking and preterm birth in urban China. *Am J Epidemiol.* 2014; 180:94–102.
23. Khader YS, Al-Akour N, Alzubi IM, Lataifeh I The association between second hand smoke and low birth weight and preterm delivery. *Matern Child Health J.* 2011; 15:453–459.
24. Cui H, Gong T-T, Liu C-X, Wu Q-J. Associations between Passive Maternal Smoking during Pregnancy and Preterm Birth: Evidence from a Meta-Analysis of Observational Studies. Lee YL, ed. *PLoS ONE.* 2016;11(1):1-18.
25. Wdowiak A, Wiktor H, Wdowiak L. Maternal passive smoking during pregnancy and neonatal health. *Ann Agric Environ Med.* 2009; 16:309-12.

26. Valsoni, BCG, et al. Effects of Passive Smoking Associated with Physical Exercise in the Skeletal Muscles of Rats During Pregnancy and Lactation. *Int. j. morphol.* 2015; 33(2): 497-506.
27. Manson JE, Hu FB, Rich-Edwards JW, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of walking as compared with vigorous exercise in the prevention of coronary heart disease in women. *The New England Journal of Medicine.* 1999; 341(9): 650-658.
28. Taylor RS, Brown A, Ebrahim S, Jolliffe J, Noorani H, Rees K, Skidmore B, Stone JA, Thompson DR, Oldridge N. Exercise-Based Rehabilitation for Patients with Coronary Heart Disease: Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *The American Journal of Medicine.* 2004; 116: 682-692.
29. Blomqvist CG, Saltin B. Cardiovascular adaptations to physical training. *Ann. Rev. Physiol.* 1983; 45:169 – 189.
30. Melzer K, Schutz Y, Bouvain M, Kayser B. Physical activity and pregnancy: cardiovascular adaptations, recommendations and pregnancy outcomes. *Sports Med.* 2010; 40(6):493-507.
31. Artal R, Wiswell RA, Drinkwater BL. *O Exercício na Gravidez.* 2nd ed. São Paulo (SP): Editora Manole; 1999.
32. Rezende J. *Obstetrícia.* 8nd ed. Rio de Janeiro (RJ): Editora Guanabara Koogan; 1998.
33. Velloso EPP, et al. Resposta materno-fetal resultante da prática de exercício físico durante a gravidez: uma revisão sistemática. 2015;25(1):93-99.
34. Carlin A, Alfirevic Z. Physiological changes of pregnancy and monitoring. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008; 22(5):801-23.

35. Borges VTM, Matsubara BB, Peraçoli JC, Calderon IMP, Abbade JF, Rudge MVC. Influência das alterações hemodinâmicas maternas sobre o desenvolvimento fetal. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2001; 23(3):147-151.
36. Finkelstein L, Bgeginski R, Tartaruga MP, Alberton CL, Kruehl LFM. Comportamento da frequência cardíaca e da pressão arterial, ao longo da gestação, com treinamento no meio líquido. *Rev Bras Med Esporte*. 2006;12(5):376-80.
37. Carpenter RE, et al. Influence of antenatal physical exercise on haemodynamics in pregnant women: a flexible randomisation approach. *BMC pregnancy and childbirth*. 2015;15(1):186-201.
38. Mottola MF. Physical activity and maternal obesity: cardiovascular adaptations, exercise recommendations and pregnancy outcomes. *Nutr Rev*. 2013;71 (Suppl 1):S31–6.
39. Pivarnik JM. Cardiovascular responses to aerobic exercise during pregnancy and postpartum. *Semin Perinatol*. 1996;20:242–249.
40. Hart MV, Morton MJ, Hosenpud J, et al. Aortic function during normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;154:887–891.
41. Batista DC, Chiara VL, Gugelmin AS, Martins PD. Atividade física e gestação: saúde da gestante não atleta e crescimento fetal. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant*. 2003; 3(2):151-8.
42. ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists). Exercise during pregnancy and the postpartum period. Washington (DC): O College: 1994.
43. ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists). Committee on Obstetric. Exercise during pregnancy and the postpartum period. *Practice n.º 267*. *Am Col Obstet Gynecol* 2002; 99: 171-3.

44. Mudd LM, Owe KM, Mottola MF, Pivarnik JM. Health benefits of physical activity during pregnancy: an international perspective. *Med Sci Sports Exerc.* 2013;45:268–77.
45. Russo LM, Nobles C, Ertel KA, Chasan-Taber L, Whitcomb BW. Physical activity interventions in pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2015;125:576–82.
46. Miquelutti MA, Cecatti JG, Makuch MY. Developing strategies to be added to the protocol for antenatal care: an exercise and birth preparation program. *Clinics.* 2015;70:231–6.
47. Perales M, Refoyo I, Coteron J, Bacchi M, Barakat R. Exercise during pregnancy attenuates prenatal depression: a randomized controlled trial. *Eval Health Prof.* 2015;38:59–72.
48. Katz VL. Water exercise in pregnancy. *Semin Perinatol.* 1996; 2: 285-91.
49. Wielgus E, Pawlicki K, Kawa A, Wloch S, Kaminski M. Fractal analysis of placenta mature villi in healthy, smoking and nonsmoking women. *Med Sci Monit.* 2000;6(2):271-7.
50. Moreira RD, et al. Fractal dimension in quantifying the degree of myocardial cellular rejection after cardiac transplantation. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery.* 2011;26(2):155-163.
51. Corvino SB, Damasceno DC, Sinzato YK, Netto AO, Macedo NCD, Zambrano E, Volpato GT. Comparative analysis of two different models of swimming applied to pregnant rats born small for pregnant age. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 2017; 89(1):223-230.

52. Cho H-S, Kim T-W, Ji E-S, Park H-S, Shin M-S, Baek S-S. Treadmill exercise ameliorates motor dysfunction through inhibition of Purkinje cell loss in cerebellum of valproic acid-induced autistic rats. *Journal of Exercise Rehabilitation*. 2016;12(4):293-298.
53. Cannon DT, Liu J, Sakurai R, Rossiter HB, Rehan VK. Impaired lung mitochondrial respiration following perinatal nicotine exposure in rats. *Lung*. 2016;194(2):325-328.
54. Mello PRB, Okay TS, Botelho C. Influência da exposição à fumaça lateral do cigarro sobre o ganho de peso e o consumo alimentar de ratas gestantes: análise do peso e do comprimento dos filhotes ao nascimento. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2006; 28(3):143-150.
55. Czekaj P, Pałasz A, Lebda-Wyborny T, Nowaczyk-Dura G, Karczewska W, Florek E, et al. Morphological changes in lungs, placenta, liver and kidneys of pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Int Arch Occup Environ Health*. 2002; 75:S27-S35.
56. Edirisinghe I, Yang S, Yao H, Rajendrasozhan S, Caito S, Adenuga D, et al. VEGFR-2 inhibition augments cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction. *The FASEB Journal*. 2008; 22:297-310.
57. Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi-Filho G, Dohnnikoff M, Pereira PM, Conceição GMS, et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1997; 30:1241-1247.
58. Volpato GT, Damasceno DC, Campos KE, Rocha R, Rudge MVC, Calderon IMP. Avaliação do efeito do exercício físico no metabolismo de ratas diabéticas prenhes. *Rev Bras Med Esporte*. 2006; 12(5):229-233.

59. Oliveira-Júnior SA, Dal Pai-Silva M, Martinez PF, Lima-Leopoldo AP, Campos DH, Leopoldo AS, et al. Diet-induced obesity causes metabolic, endocrine and cardiac alterations in spontaneously hypertensive rats. *Med Sci Monit.* 2010;16(12):367–73.
60. Padulla AST, Azoubel R, Bonfim MR, Accioly MF, Camargo Filho JCS, Padovani JA, Souza DRS. Effects of statin and aerobic physical exercise association in the cardiomyocytes of the rat: morphometric study. *International Journal of Morphology.* 2009; 27(1):83-88.
61. Liberatori Filho AW, Lopes RD, Mora OA, Simões MJ, Lopes AC. Estudo histomorfométrico dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo das ratas albinas durante a prenhez. *Revista da Associação Médica Brasileira.* 1999; 45(3):242-246.
62. Pacagnelli FL et al. Fractal Dimension in Quantifying Experimental-Pulmonary-Hypertension-Induced Cardiac Dysfunction in Rats. *Arquivos brasileiros de cardiologia.* 2016; 107(1):33-39.
63. Ozaki G et al. Análisis Fractal de Tejido Muscular Esquelético en Ratas Sometidas a Lesión por Estiramiento. *International Journal of Morphology.* 2015; 33(3):908-913.
64. Baish JW, Jain RK. Fractals and Cancer. *Cancer Res.* 2000;60(14):3683-3688.
65. Coleman T. Reducing Harm From Tobacco Smoke Exposure During Pregnancy. *Birth Defects Research.* 2008; 84:73-79.
66. Mello PR, Pinto GR, Botelho C. The influence of smoking on fertility, pregnancy and lactation. *J Pediatr.* 2001; 77:257-264.
67. Mello PRB, Okay TS, Botelho C. The effects of exposing rats to cigarette smoke on milk production and growth of offspring *Jornal de Pediatria.* 2007; 83(3):267-273.

68. Lee LJ, Lupo PJ. Maternal Smoking During Pregnancy and the Risk of Congenital Heart Defects in Offspring: A Systematic Review and Metaanalysis. *Pediatr Cardiol*, 2012;1-10.
69. Raisanen S, Sankilampi U, Gissler M, et al. Smoking cessation in the first trimester reduces most obstetric risks, but not the risks of major congenital anomalies and admission to neonatal care: a population-based cohort study of 1,164,953 singleton pregnancies in Finland. *Journal of epidemiology and community health*. 2014;68(2):159–164.
70. Suzuki K, Sato M, Zheng W, Shinohara R, Yokomichi H, Yamagata Z. Effect of maternal smoking cessation before and during early pregnancy on fetal and childhood growth. *Journal of epidemiology / Japan Epidemiological Association*. 2014;24(1):60–66.
71. Perkins KA, Sexton JE, DiMarco A, Fonte C. Acute effects of tobacco smoking on hunger and eating in male and female smokers. *Appetite*. 1994;22(2):149-58.
72. Williams CM, Kanagasabai T. Maternal adipose tissue response to nicotine administration in the pregnant rat: effects on fetal body fat and cellularity. *Br J Nutr*. 1984;51(1):7-13.
73. Moriel P, Madureira HL, Uwagoya AKY; Wlian L, Pincinato ED. Influência do fumo na atividade da amilase salivar e na curva glicêmica. *Rev. Nutr*. 2010;23(4):565-572.
74. Krzyścin M, Dera-Szymanowska A, Napierała M, et al. Effects of active and passive smoking during pregnancy on the development of gestational hypertension and fetal hypotrophy. *Przegl Lek*. 2015;72:131–135.

75. Ko TJ, Tsai LY, Chu LC, Yeh SJ, Leung C, Chen CY, et al. Parental smoking during pregnancy and its association with low birth weight, small for gestational age, and preterm birth offspring: a birth cohort study. *Pediatr Neonatol.* 2014;55:20–7.
76. Blatt K, Moore E, Chen A, Van Hook J, DeFranco E. Association of reported trimester-specific smoking cessation with fetal growth restriction. *Obstet Gynecol.* 2015;125:1452–9.
77. Harrod CS, Reynolds RM, Chasan-Taber L, Fingerlin TE, Glueck DH, Brinton JT, Dabelea D. Quantity and timing of maternal prenatal smoking on neonatal body composition: the healthy start study. *J Pediatr.* 2014;165:707–12.
78. Chelchowska M. et al., The effect of tobacco smoking during pregnancy on plasma oxidant and antioxidant status in mother and newborn. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;155(2):132-6.
79. Kim C. Gestational diabetes: risks, management, and treatment options. *Int J Womens Health.* 2010;2:339-251.
80. Yang H, Schmidt LP, Wang Z, et al. Dynamic Myofibrillar Remodeling in Live Cardiomyocytes under Static Stretch. *Scientific Reports.* 2016;6:20674.
81. De Oliveira MAB, Brandi AC, dos Santos CA, et al. Comparison of fractal dimension and Shannon entropy in myocytes from rats treated with histidine-tryptophan-glutamate and histidine-tryptophan cetoglutamate. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular: órgão oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular.* 2014;29(2):156-162.
82. Captur G, et al. Abnormal cardiac formation in hypertrophic cardiomyopathy: fractal analysis of trabeculae and preclinical gene expression. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2014;7:241–248.

83. Cong J et al. Structural and functional changes in maternal left ventricle during pregnancy: a three-dimensional speckle-tracking echocardiography study. *Cardiovasc Ultrasoun.* 2015;13:6.
84. Hill JA. Braking Bad Hypertrophy. *N. Engl. J. Med.* 2015;372:2160–2162.
85. Schulkey CE, Regmi SD, Magnan RA, et al. The maternal-age-associated risk of congenital heart disease is modifiable. *Nature.* 2015;520:230-23.
86. Alverson CJ, et al. Maternal smoking and congenital heart defects in the Baltimore-Washington Infant Study. *Pediatrics.* 2011;127(3):e647-53.
87. Chehab G, et al. [Parental smoking during early pregnancy and congenital heart defects]. *J Med Liban.* 2012;60(1):14-8.
88. Hackshaw A, Rodeck C, Boniface S. Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls. *Hum Reprod Update.* 2011;17(5):589-604.
89. Özbeyli, Dilek, et al. Protective effect of alpha-lipoic acid, aerobic or resistance exercise from colitis in second hand smoke exposed young rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2017;44(1):62-70.
90. Chelchowska M. et al., The effect of tobacco smoking during pregnancy on plasma oxidant and antioxidant status in mother and newborn. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011 ;55(2):132-6.