

Artigo original

Marcadores de exposição tabágica em ratas lactantes utilizando um modelo de exposição passiva desde o início da gestação

Tobacco exposure markers in lactating rats, using a passive exposure model from the beginning of pregnancy

Paulo Roberto Bezerra de Mello¹, Thelma Suely Okay², Eliana Freire Gaspar de C. Dores³, Clovis Botelho⁴

RESUMO

Introdução: marcadores de exposição tabágica permitem avaliar a intensidade da exposição à fumaça do tabaco, quantificando a absorção da fumaça pelo fumante. O objetivo deste estudo é avaliar a intensidade da exposição tabágica em ratas lactantes, utilizando um modelo simplificado de exposição passiva, desde o início da gestação, por meio da medida de cotinina e carboxiemoglobina em sangue animal. **Metodologia:** ratas foram expostas, do segundo dia de gestação ao 17º dia de lactação, ao ar comprimido (n=18), à fumaça de 5 cigarros (n=15) e comparadas a grupo não exposto (n=18), segundo o sistema de exposição descrito por Le Mesurier et al, e modificado por Silva et al, variando a quantidade de cigarros e o número de dias de exposição. A cotinina plasmática e a carboxiemoglobina foram determinadas pela técnica adaptada de Feyerabend et al e pela técnica de Beutler e West, respectivamente. **Resultados:** a detecção de cotinina ocorreu somente nos animais expostos à fumaça do tabaco (mediana 78,8 ng/mL; min 25,4 nd/mL – max 223,3 ng/mL) e a mediana de carboxiemoglobina foi significativamente mais elevada nos animais fumantes (mediana 11,4%; min 5,7% – max 11,8%) do que nos animais dos grupos de controle (mediana 0,1%; min 0,1% – max 1,22%) e expostos ao ar comprimido (mediana 0,1%; min 0,1% – max 1,1%). **Conclusão:** para o modelo de exposição animal estudado e com animais em fase de reprodução, foi possível detectar cotinina e elevação do percentual sanguíneo de carboxiemoglobina, nos animais expostos à fumaça do tabaco.

Descritores: tabagismo, modelo experimental, cotinina, carboxiemoglobina, rato.

ABSTRACT

Introduction: tobacco exposure markers are useful to measure the intensity and absorption of tobacco smoke. Cotinine and carboxyhemoglobin have been used as exposure marker in both human and animal studies and reflect the particulate and the gaseous phase of tobacco smoke respectively. The objective is evaluating the intensity of tobacco exposure using a simplified passive exposure model in lactating rats and measuring cotinine and carboxyhemoglobin in animal blood. **Methodology:** rats were exposed from the second day of pregnancy to the 17th day of lactation, to air flush of 10 liters/min. (n=17), to air flush plus tobacco smoke – 2 cigarettes/animal/day (n=15) and compared to unexposed non manipulated controls (n=17). Plasma cotinine was determined as described by Feyerabend et al. (1986) and carboxyhemoglobin was determined using the method described by Beutler and West (1984), adapted to rat blood. **Results:** cotinine was detected in all animals exposed to tobacco smoke (median 78.8 ng/mL; min 25.4 nd/mL – max 223.3 ng/mL) but not in non smoking groups. Carboxyhemoglobin was significantly higher in exposed animals (median 11.4%; min 5.7% – max 11.8%) than in air flush (median 0.1%; min 0.1% – max 1.1%) and control group (median 0.1%; min 0.1% – max 1.1%). **Conclusion:** using a single exposure model and working with animals in the reproduction cycle, it was possible to detect cotine and higher leves of carboxyhemoglobin in animals exposed to tobacco smoke.

Keywords: tobacco, experimental model, cotinine, carboxyhemoglobin, rat.

1. Professor Doutor do Departamento de Pediatria da FCM/UFMT.

2. Professora Doutora do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da USP/ SP.

3. Professora Doutora do Departamento de Química/ ICET da UFMT.

4. Professor Doutor do Departamento de Clínica Médica/FCM e do Instituto de Saúde Coletiva da UFMT

Trabalho realizado na Faculdade de Ciências Médicas/UFMT (Experimentos), no Laboratório de Análise de Biocidas do Departamento de Química/UFMT (dosagem da cotinina) e no Laboratório Toxicon – São Paulo (dosagem da carboxiemoglobina) e no Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

Endereço para correspondência: Clovis Botelho. Rua Dr. Jonas Correa da Costa, 210. 78.030-510 – Cuiabá/MT. Fone/Fax: 65. 637 1471 e-mail: fbotelho@terra.com.br

Recebido para publicação no dia 27/10/2000 e aceito em 13/12/2005, após revisão.

INTRODUÇÃO

Os marcadores de exposição ao tabaco permitem a avaliação objetiva do grau de tabagismo e a quantificação da absorção de fumaça pelo fumante.¹ Os marcadores mais utilizados são: percentual de carboxiemoglobina (HbCO) no sangue, monóxido de carbono no ar expirado, as medidas das concentrações de tiocianato no plasma e de nicotina e cotinina no plasma, saliva e urina.² A nicotina apresenta meia-vida curta (cerca de 1 a 2 horas), o que dificulta a detecção desta substância nos fluidos corporais para diagnóstico e quantificação da exposição tabágica, tanto ativa quanto passiva.³

A carboxiemoglobina é um marcador de fase gasosa do cigarro e também sofre influência dietética e da presença de monóxido de carbono no ambiente,⁴ o que pode comprometer sua confiabilidade como marcador do tabagismo.

Por ser mais polar e menos lipofílica que a nicotina, a cotinina apresenta volume de distribuição relativamente restrito em comparação à nicotina.⁵ Devido à baixa taxa de metabolismo e de excreção renal, sua meia-vida na circulação é 10 vezes mais longa - 19 a 40 horas, comparado com 30 a 110 minutos da nicotina e sua concentração é relativamente estável durante todo o dia de um tabagista.^{5,6,7}

Assim, por estar presente no sangue em maior concentração e por mais tempo que a nicotina,⁸ e ainda, por ser específica para a exposição ao tabaco,⁵ e possuir distribuição nos fluidos corporais mais restrita, a cotinina tem sido o marcador mais utilizado para avaliar o consumo de tabaco, bem como para controle de sua abstinência.

Modelos experimentais são particularmente úteis em toxicologia para o estudo de aspectos que não podem ser investigados de maneira adequada em seres humanos. Muito embora existam limitações metodológicas na toxicologia experimental, ela permite a estimativa do impacto que a exposição passiva ao tabaco causaria na saúde humana.⁹

Estudos em ratos de laboratório permitem analisar os efeitos nocivos do tabaco em períodos de tempo mais curtos, com custo reduzido. Além disso, os efeitos tóxicos da fumaça do tabaco sobre os animais podem ser amenizados, realizando-se adaptação gradativa dos animais às exposições de intensidade crescente, modificando-se o método de exposição, e ainda, adequando-se o tipo de animal ao objetivo do estudo.¹⁰

Sistemas de exposição à fumaça lateral do cigarro, que mimetizam exposição passiva ao tabaco, utilizam câmaras de metragem cúbica definida, e o corpo do animal é exposto totalmente. A exposição é controlada por indicadores, como a contagem de material particulado, medida por meio de monitores óticos de dispersão de partículas, e pela mensuração do monóxido de carbono e nicotina no ar inalado analisados separadamente ou em conjunto.^{11,12}

Estudos experimentais têm sido realizados, em

nosso meio, com sistemas simplificados de exposição passiva à fumaça do cigarro baseados no protocolo descrito por Le Mesurier *et al.*,¹³ modificado por Cendon Filha¹⁴ e por Silva *et al.*¹⁵ Este estudo teve como objetivo avaliar a utilização deste tipo de exposição em estudo experimental dentro do ciclo reprodutivo animal, usando como marcador de exposição de fase particulada - cotinina e como marcador de fase gasosa - carboxiemoglobina.

METODOLOGIA

Este estudo está inserido em projeto de pesquisa de avaliação dos efeitos da exposição à fumaça lateral do tabaco, desenvolvido em ratas, na qual foram analisados parâmetros associados à nutrição, ao crescimento intra-uterino e à lactação.¹⁶

Foram estudadas ratas virgens, de quatro meses de idade (*Ratus Norvegicus*), da cepa Wistar, fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso e mantidas no Biotério do Laboratório de Investigação da Faculdade de Ciências Médicas da UFMT, em temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade de 40 a 60% e ciclo de luz controlado (12 horas de claridade e 12 horas de escuridão). Os animais foram pesados à admissão e numerados por perfuração do pavilhão auricular. Foram aceitos animais com peso entre 230 e 260 gramas (balança analítica marca Marte A 500, com capacidade de 500 gramas, e variação de 0,01 g), alimentados com ração NUVILAB (NUVITAL, Curitiba, PR) e água *ad libitum*.

Para exposição dos animais foram utilizados cigarros da marca Marlboro (Phillip Moris), embalagem vermelha com 20 unidades, cada cigarro contendo 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono (o rótulo do produto indica que estes valores foram aferidos, por amostragem, no Laboratório Labstat do Canadá). O sistema de exposição utilizado foi baseado no descrito por Le Mesurier *et al.*¹³ e Cendon Filha,¹⁴ modificado por Silva *et al.*¹⁵

Para a avaliação dos marcadores de exposição passiva ao tabaco em animais em reprodução, foram estudadas ratas divididas em três grupos:

- Grupo Fumante: animais expostos à fumaça de 2 cigarros/animal/dia, sob fluxo de ar comprimido (10 litros/min), em câmara de inalação, durante 15 minutos, duas vezes ao dia, durante a gestação e lactação (n=15);

- Grupo Ar Comprimido: animais expostos a fluxo de ar comprimido (10 litros/min) em câmara de inalação, durante 15 minutos, duas vezes ao dia, durante a gestação e lactação (n=18).

- Grupo Controle: animais que não sofreram exposição ou manipulação, exceto aquelas necessárias à pesagem e à coleta de amostras de sangue (n=18);

Os animais do grupo fumante e do grupo ar comprimido foram subdivididos, em grupos de 5 animais cada, para serem submetidos à inalação por 15 minu-

tos, duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas, a partir do 2º dia de gestação, até o 17º dia de lactação, quando foram então sacrificados. Durante a exposição, os animais do grupo fumante receberam a fumaça lateral dos cigarros, queimados completamente e ventilados por um fluxo de ar comprimido (10 litros por minuto). A quantidade de cigarros utilizada foi de 5 cigarros por exposição, ou seja, 2 cigarros/animal/dia. Os animais do grupo ar comprimido utilizaram sistema de exposição exclusivo para este grupo, porém idêntico ao do grupo fumantes, no qual receberam fluxo de ar comprimido semelhante (10 litros por minuto), na mesma frequência e duração, nos mesmos horários.

No último dia do experimento (17º dia de lactação), após exposição dos animais dos grupos fumantes e ar comprimido, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico. As amostras de sangue foram colhidas da veia cava, em tubos a vácuo BD, contendo heparina, e em seringas BD heparinizadas, para as dosagens de carboxiemoglobina e cotinina, respectivamente. Para a determinação da cotinina plasmática, a amostra de sangue foi centrifugada por 5 minutos, a 3.000 rpm, em centrífuga refrigerada a 4°C; o plasma foi separado e armazenado em temperatura de -20°C, até ao momento das análises.

Para determinação da cotinina plasmática foi adaptado o protocolo de Feyerabend et al.³ A cotinina foi mensurada em cromatógrafo gasoso Agilent HP 6890, com detector de nitrogênio e fósforo, usando nitrogênio como gás de arraste e lignocaína como padrão interno. Foi utilizada coluna capilar HP-5 com 5% de fenil metil siloxano, medindo 30 metros de comprimento, 320 micrometros de diâmetro interno, 0,25 micrometros de espessura de fase.

Para determinação da carboxiemoglobina em sangue de rato foi utilizada técnica descrita por Beutler e West¹⁷ e um espectrofotômetro Milton Roy, modelo Stectropnic Genezys %, monofeixe. Esta técnica mede a fração de HbCO, a partir da relação de absorvância (Ar) da amostra a ser determinada, reduzida em ditio-nito de sódio em 2 comprimentos de onda (420 e 432 nm), de acordo com a fórmula:

$$\text{Fração de COHb} = \frac{(1-[Ar]F1)}{Ar(F2-F1)-F3+1}$$

Onde Ar é a relação entre as absorvâncias da amostra lida a 420 e 432 nm e F1, F2 e F3 fatores de cálculo espécie-específica do espectrofotômetro utilizado.

O estudo laboratorial foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Médicas da UFMT (Experimentos), no Laboratório de Análise de Biocidas do Departamento de Química/UFMT (dosagem da cotinina) e no Laboratório Toxicon – São Paulo (dosagem da carboxiemoglobina).

A tabulação dos dados foi feita no programa Excel e as análises estatísticas com o programa SPSS versão

9.0 para Windows. O teste de Lavene foi utilizado para verificação do comportamento da distribuição das variáveis numéricas. Da mesma maneira, para as comparações de dados não paramétricos utilizou-se os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob nº 777/01, em 25 de outubro de 2001.

RESULTADOS

Os animais expostos passivamente à fumaça do cigarro apresentaram mediana de cotinina de 78,8 ng/mL, ao contrário dos não fumantes – expostos ao ar comprimido e não manipulados. Na leitura cromatográfica, os plasmas desses animais não apresentaram cotinina detectável em suas leituras cromatográficas, ou seja, não ultrapassaram os limites de detecção do método, que foi o valor expresso como mediana (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores das medianas, valores mínimo e máximo das concentrações plasmáticas de cotinina dos animais dos três grupos de estudo – fumantes (F), ar comprimido (AR) e controles (C).

Grupo de Estudo	N	Cotinina (ng/mL)
Fumante	15	78,8 (25,4 – 223,3)
Ar comprimido	17	4,41
Controle	17	4,41

Kruskal-Wallis $p < 0,001$ e Mann-Whitney comparando C x F $p < 0,001$; C x Ar NS; Ar x F $p < 0,001$

As ratas expostas à fumaça do tabaco ao longo da gestação até o 17º dia de lactação mostraram medianas de carboxiemoglobina mais elevadas que os animais dos grupos controle e ar comprimido, conforme a análise não paramétrica (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores das medianas, valores mínimo e máximo dos percentuais de carboxiemoglobina (COHb) dos animais dos três grupos de estudo – fumantes (F), ar comprimido (AR) e controles (C).

Grupo de estudo	N	COHb (%)
Fumante	15	11,4 (5,7 – 11,8)
Ar comprimido	17	0,1 (0,1 – 1,1)
Controle	17	0,1 (0,1 – 1,22)

Kruskal-Wallis $p < 0,001$ e Mann-Whitney comparando C x F $p < 0,001$; C x Ar NS; Ar x F $p < 0,001$

DISCUSSÃO

Os valores de carboxiemoglobina obtidos neste estudo, entre 5,7% a 11,8%, foram semelhantes aos de outros relatos que também utilizaram ratas grávidas

expostas a fumaça lateral do tabaco e obtiveram níveis de carboxiemoglobina entre 6 e 12%. Estes níveis foram semelhantes àqueles obtidos em fumantes crônicos humanos que consomem entre 10 e 20 cigarros por dia.^{18,19}

Tachi e Aoyama,²⁰ utilizando quantidade maior de cigarros (3 vezes mais), com tempo de exposição quatro vezes mais prolongado, porém com a mesma frequência (duas exposições ao dia). Estes autores obtiveram saturação máxima de CO no sangue venoso das ratas da ordem de 57%. A exposição de ratas grávidas à fumaça lateral de cigarros comerciais de 0,9 mg de nicotina, em caixas de 150 dm³, na frequência de 01 a 04 cigarros por dia, produziu níveis de carboxiemoglobina que variaram de 6 a 12%, níveis estes semelhantes aos observados neste estudo. Com este nível de exposição, foi observada redução de crescimento intra-uterino dos filhotes, com reduções de peso ao nascer que variaram de 41%, para um cigarro/dia, até 73%, para quatro cigarros/dia.¹⁹

Murrin *et al.*²¹ administraram nicotina em ratos, por bombeamento osmótico com mini-bomba, e procuraram ajustar a dose administrada (1,5 mg/kg/dia) àqueles que produziam níveis plasmáticos de nicotina nos ratos semelhantes aos níveis plasmáticos encontrados em humanos que fumam 20 cigarros ao dia. Estes autores observaram relação linear entre a quantidade de nicotina passada ao animal e as concentrações plasmáticas de nicotina e cotinina. Com base nestes achados, e considerando os níveis médios de cotinina encontrados neste estudo, pode-se inferir que os animais receberam dose de nicotina que corresponde a, aproximadamente, a terça parte da dose de 1,5 mg/kg/dia utilizada por Murrin *et al.*²¹ Estabelecendo a correspondência para seres humanos, os valores de cotinina encontrados, no presente estudo, corresponderiam ao consumo de um fumante ativo que fuma cerca de 7 cigarros/dia.

Por outro lado, Subramanian *et al.*¹² avaliaram o efeito da exposição a fumaça lateral de cigarros em ratas grávidas, em modelo de exposição passiva em caixa de 0,7 m³, duas exposições ao dia, de 3 horas cada. Este

autor controlou a exposição pela concentração de material particulado na fumaça a ser inalada, da cotinina e da carboxiemoglobina, no sangue materno. Observou níveis médios de carboxiemoglobina de 9±3% e que o valor máximo de cotinina foi de 178,4 ng/mL, atingido entre a 4ª e a 5ª hora de exposição. Os valores dos marcadores, dosados nos horários de exposição, são semelhantes aos deste estudo, que foram colhidos 15 minutos após o final de exposição. No entanto, os resultados encontrados por Subramanian *et al.*¹² também permitem concluir que as concentrações plasmáticas de cotinina encontradas em nosso estudo não refletem o pico atingido pela substância, após a exposição à fumaça lateral de cigarros, o que só viria a ocorrer cerca de 4-5 horas após a exposição.

Segundo Lymperopoulou *et al.*,²² a cotinemia a partir da qual se considera que haja impregnação tabágica varia entre 10ng/mL e 47ng/mL. Assim, pode-se concluir, com base nos valores de cotinina encontrados, que o modelo de exposição desse estudo está dentro de limites capazes de exercer ação nicotínica nos animais expostos. Portanto, os valores dos marcadores, da cotinina e da carboxiemoglobina sugerem que este modelo de exposição pode, por meio de ação tabágica, influenciar a função reprodutiva animal.

Este estudo mostrou que, quando animais expostos à fumaça do tabaco foram comparados a não expostos, houve diferenças estatisticamente significantes entre eles, com relação tanto a cotinina quanto a carboxiemoglobina. Este fato sugere que o referido sistema de exposição pode ser utilizado em animais de experimentação, para obtenção de efeitos decorrentes de ação da nicotina, visto que seu metabólito foi detectado em ratas em fase reprodutiva. O presente estudo abre novas perspectivas para aprofundar os conhecimentos ora adquiridos, no sentido de completar a validação de sistemas de exposição passiva à fumaça do tabaco, em nosso meio. Seria oportuno avaliar as concentrações dos dois marcadores laboratoriais (cotinina e carboxiemoglobina), 3 a 4 horas após a exposição, isto é, no pico de concentração sanguínea dos mesmos.

REFERÊNCIAS

1. Barlow RD, Stone RB, Wald NJ, Puhakainen EVJ. The direct barbituric acid assay for nicotine metabolites in urine: a simple colorimetric test for the routine assessment of smoking status and cigarettes smoke intake. *Clin Chim Acta* 1987;165:45-52.
2. Haufroid V e Lison D. Urinary cotinine as a tobacco-smoke exposure index: a minireview. *Int Arch Occup Environ Health* 1998;71:162-8.
3. Feyerabend C, Bryant AE, Jarvis MJ, Russel MAH. Determination of cotinine in biological fluids of nonsmokers by packed column gas liquid chromatography. *J Pharm Pharmacol*. 1986;38:917-9.
4. Sepkovic DW e Haley NJ. Biomedical application of cotinine quantitation in smoking related research. *Am J Public Health*. 1985;75:663-5.
5. Benowitz NL, Kuyt F, Jacob P III, Jones RT. Cotinine disposition and effects. *Clin Pharmacol Ther*. 1983;34:604-11.
6. Etzel RA, Greenberg RA, Haley NJ, Loda FA. Urine cotinine excretion in neonates exposed to tobacco smoke products in utero. *J Pediatr*. 1985;107: 146-8.
7. Jacob PJ, Benowitz NL, Shulgin AT. Recent studies of nicotine metabolism in humans. *Pharmacol Biochem Behav*. 1988; 30:249-53.
8. Langonne J J, Gijika H B, Van Vunaski H. Nicotine and its metabolites: radioimmunoassays for nicotine and cotinine. *Biochemistry*. 1973;12:5025-30.
9. Witschi H, Joad JP, Pinlerton KE. The toxicology of environmental tobacco smoke. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:29-52.
10. Kendrick J, Nettersheim P, Guerin M, Caton J, Dalbey W, Griesemer R, Rubin I, Maddox W. Tobacco smoke inhalation studies in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1976;37:557-567.
11. Zhu BQ, Sun YP, Sievers RE, Glantz SA, Parmlev WW, Wolfe CL. Exposure to environmental tobacco smoke increases myocardial infarct size in rats. *Circulation*. 1994;1282-90.
12. Subramaniam S, Srinivasan S, Bummer PM, Gairola CG. Perinatal sidestream cigarette smoke exposure and the developing pul-

- monary surfactant system in rats. *Hum Exp Toxicol* 1999;18:206-11.
13. Le Mesurier SM, Stewart BW, Lykke AW. Injury to type-2 pneumocytes in rats exposed to cigarette smoke. *Environ Res* 1981;24:207-17.
 14. Cendon Filha SP. Enfisema pulmonar. Modelo experimental em ratos expostos à fumaça do cigarro [dissertação]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1993.
 15. Silva RMVG, Santos MGL, Botelho C. Influência do tabagismo no ganho ponderal, crescimento corporal, consumo alimentar e hídrico de ratos. *J Pneumol* 1997;23:124-9.
 16. Mello PRB. Efeito do tabagismo sobre a liberação de prolactina, produção Láctea e componentes imunes do leite de ratas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.
 17. Beutler E, West C. Simplified determination of carboxyhemoglobin. *Clin Chem* 1984;30:871-4.
 18. Younoszai MK, Peloso J, Haworth JC. Fetal growth retardation in rats exposed to cigarette smoke during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1969;104:1207-13.
 19. Nelson E, Jodscheit K, Guo Y. Maternal passive smoking during pregnancy and fetal developmental toxicity. Part 1: gross morphological effects. *Hum Exp Toxicol* 1999;18:252-6.
 20. Tachi N, Aoyama M. Effect of cigarette smoke and carbon monoxide inhalation by gravid rats on the conceptus weight. *Bul Environ Con Toxicol* 1983;31:85-92.
 21. Murrin LC, Ferrer JR, Wanyun Z, Haley NJ. Nicotine administration to rats: methodological considerations. *Life Sciences* 1987;40:1699-708.
 22. Lympelopoulou A, Hainaut F, Crimal PH, Durand JL, Locatelli C, Maison C. Tabac et grossesse: recherche d'une corrélation cotininémie et Doppler. *J Gynecol Obster Biol Reprod* 1996;25:824-7.