



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

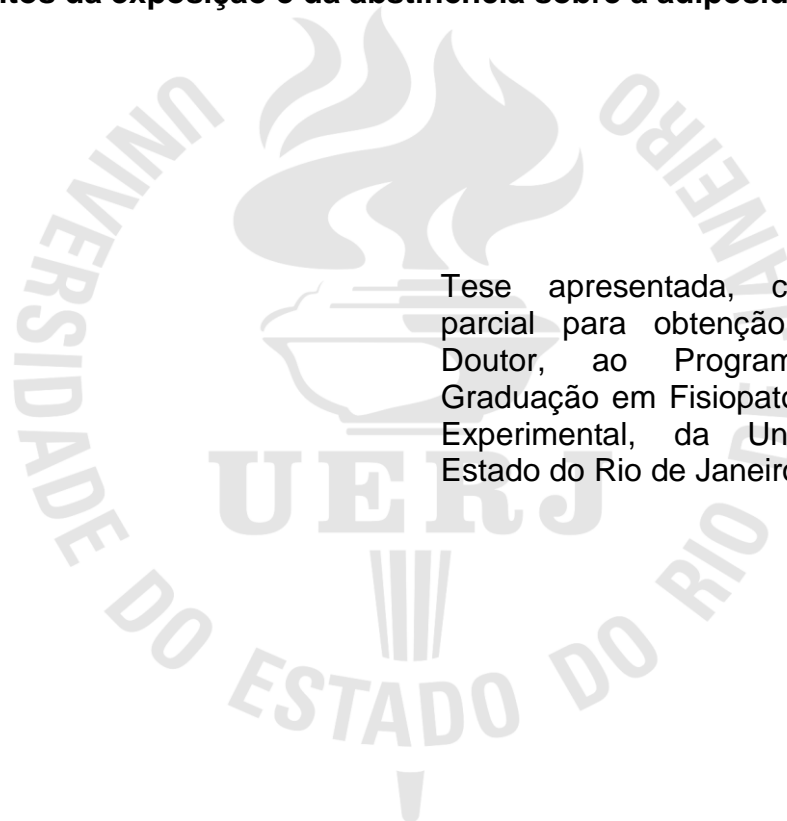
Rejane Pontes Gaspar Reis

**Fumaça de cigarro durante a adolescência de camundongos  
fêmeas e machos: efeitos da exposição e da abstinência sobre a  
adiposidade.**

Rio de Janeiro  
2016

Rejane Pontes Gaspar Reis

**Fumaça de cigarro durante a adolescência de camundongos fêmeas e machos:  
efeitos da exposição e da abstinência sobre a adiposidade.**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Celly Cristina Alves Nascimento Saba

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Érica Patricia Garcia de Souza

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R375 Reis, Rejane Pontes Gaspar.  
Fumaça de cigarro durante a adolescência de camundongos fêmeas e machos: efeitos da exposição e da abstinência sobre a adiposidade / Rejane Pontes Gaspar Reis. - 2016.  
95 f.

Orientadora: Celly Cristina Alves Nascimento Saba.  
Coorientadora: Érica Patricia Garcia de Souza.  
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Fumo - Teses. 2. Tecido adiposo - Teses. 3. Fumaça - Efeito fisiológico – Teses. 4. Tabaco – Desenvolvimento e crescimento. I. Saba, Celly Cristina Alves Nascimento. II. Souza, Érica Patricia Garcia de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 613.84

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Rejane Pontes Gaspar Reis

**Fumaça de cigarro durante a adolescência de camundongos fêmeas e machos:  
efeitos da exposição e da abstinência sobre a adiposidade.**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 04 de março de 2016.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Érica Patricia Garcia de Souza  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dra. Celly Cristina Alves Nascimento Saba (Orientadora)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Soares da Costa  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

---

Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

---

Prof. Dr. Ligia de Albuquerque Maia  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

---

Prof. Dr. Cristiane Aguiar da Costa  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Rio de Janeiro

2016

## DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, em especial ao meu marido Paulo César e ao meu filho Eduardo que em muitos momentos foram companheiros e compreensivos durante toda a minha trajetória.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Celly Cristina Alves Nascimento Saba, pela sua amizade e compreensão, pela presença segura e competente, tornando possível a realização de um projeto que idealizamos.

A minha coorientadora Érica Patrícia Garcia de Souza, por ter me aceitado em ser minha orientadora e confiado no meu trabalho.

À minha amiga Viviane do Laboratório de Farmacologia e toda equipe do Laboratório por terem me ajudado e ensinado as técnicas para que eu possa conquistar e atingir o meu objetivo.

À minha estagiária Ninive por te me ajudado nos experimentos.

Aos meus amigos Aline, Aluana, Carlos, Gabriele, Vivian, Amélia e Fabiana por terem me ajudado e ensinado as técnicas.

Às secretárias do FISCLINEX, por ter me orientado em todos os assuntos da pós-graduação.

À técnica Andreia do Laboratório, por ter contribuído com sua experiência.

Ao meu amigo Nelcir, por ter me ajudado em tudo.

E àqueles, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

A todos, muito obrigada!

O futuro me aguarda.

*Eduardo Reis*

## RESUMO

GASPAR-REIS, Rejane Pontes. **Fumaça de cigarro durante a adolescência de camundongos fêmeas e machos: efeitos da exposição e da abstinência sobre a adiposidade**. 2016. 95 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

O consumo de tabaco é uma das grandes pandemias de todos os tempos. Os índices de tabagismo entre adolescentes do sexo masculino e, principalmente, do sexo feminino vêm crescendo. Assim o objetivo foi avaliar a influência do fumo na puberdade e na abstinência na vida adulta, sobre aspectos relacionados à composição corporal e à adiposidade de camundongos Swiss, fêmeas e machos. Aos 35 dias de idade, as fêmeas e os machos foram submetidos à câmara de fumaça, onde foram divididos em dois grupos experimentais. Após quinze dias de exposição, metade dos animais de cada grupo foi sacrificada. A outra metade permaneceu em abstinência por trinta dias. Ao final da exposição à fumaça ou após trinta dias de abstinência, os animais foram avaliados *in vivo*, para determinação da tolerância a glicose e para determinação da composição corporal por DXA e, em seguida foram sacrificados para coleta de tecidos e realização das demais análises. Durante a exposição à fumaça, a massa corporal dos animais fumantes fêmeas e machos (F/15) foi menor que a de seus respectivos controles, com baixo ou nenhum ganho de massa durante os 15 d. Nesse período, a ingestão alimentar diária e a ingestão calórica foram semelhantes entre os grupos C e F/15. Durante os 30 dias de abstinência, a tendência ao ↑ de ingestão alimentar determinou maior ingestão calórica no grupo ex-fumante, que foi traduzida pelo aumento da massa corporal nas fêmeas, mas não nos machos. A exposição à fumaça para as fêmeas foi um fator indutor do ganho de gordura do tronco e total, refletida pelo ganho de massa de TAR. Esses dados são confirmados pelo maior índice de adiposidade e concentração plasmática de leptina, verificados nas fêmeas fumantes. Na avaliação de índice glicêmico, fêmeas expostas à fumaça apresentaram concentrações plasmáticas aumentadas de glicose e insulina, no entanto, com ↓ atividade das células beta pancreáticas, indicando possível alteração da ação da insulina. O TAR também foi avaliado em relação ao estresse oxidativo, onde a catalase não revelou alteração nas fêmeas mas ↑ nos machos e a GPx, sua atividade se encontrava ↓ nas fêmeas e ↑ nos machos. A oxidação proteica foi determinada por carbonilação que evidenciou aumento nas fêmeas. A cessação do hábito de fumar, não reverte os danos provocados pela fumaça, cujo potencial tóxico permanece expressivo, afetando a composição corporal, a estrutura e função do tecido adiposo intra-abdominal.

Palavras-chave: Tecido Adiposo, Abstinência, Exposição à fumaça de cigarro, tabaco, Adiposidade



## ABSTRACT

GASPAR-REIS, Rejane Pontes. Cigarette smoke during adolescence of female and male mice: effects of exposure and abstinence on adiposity. 2016. 95 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Tobacco use is one of the great pandemics of all time. The smoking rate among male adolescents, and especially female growing. So the objective was to evaluate the influence of smoking on puberty and on abstinence in adult life, on issues related to body composition and adiposity Swiss mice, females and males. At 35 days of age, females and males were subjected to the smoke chamber, where they were divided into two experimental groups. After fifteen days of exposure, half the animals in each group were sacrificed. The other half remained abstinent for thirty days. At the end of exposure to smoke or after thirty days of abstinence, the animals were evaluated in vivo for determination of glucose tolerance and determination of body composition by DXA and then were sacrificed to collect tissue and conducting other analyzes. During exposure to smoke, the body mass of animals-smoking males and females (F / 15) was lower than that of their respective controls, with low or no weight gain during the 15 d. During this period, the daily caloric intake and food intake were similar between C and F / 15 groups. During the 30 days of abstinence, the trend to ↑ food intake determined higher caloric intake in ex-smoker group, which was translated by an increase in body mass in females but not in males. Exposure to smoke for females was a factor inducing the gain of fat trunk and total reflected by the mass gain of ART. These data are confirmed by the higher fat content and leptin levels, checked in smoking females. The glycemic index rating, females exposed to smoke had increased plasma concentrations of glucose and insulin, however, with ↓ activity of pancreatic beta cells, indicating a possible change in insulin action. The ART was also assessed in relation to oxidative stress, where catalase showed no alteration in females but ↑ in males, GPx activity was at its ↓ in females and males. The protein oxidation was determined by carbonylation which showed an increase in females. The cessation of smoking, does not reverse the damage caused by smoke, whose toxic potential remains significant, affecting body composition, structure and function of the intra-abdominal adipose tissue.

Keywords: Adipose tissue, Abstinence, Exposure to cigarette smoke, tobacco, Adiposity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Tipos de tabaco mais cultivados e usados.....	18
Figura 2 –	Estrutura do cigarro de papel.....	24
Figura 3 –	Componentes do tecido adiposo.....	31
Figura 4 –	Distribuição anatômica do tecido adiposo branco em humanos.....	32
Figura 5 –	Distribuição anatômica do tecido adiposo branco em roedores.....	33
Figura 6 –	Fontes enzimáticas de ânion superóxido.....	37
Figura 7 –	Ação catalisadora das enzimas antioxidantes sobre os agentes reativos.....	39
Figura 8 –	Fotografia da câmara de fumaça (Davis, CA) .....	45
Figura 9 –	Delineamento experimental do projeto desde o desmame até o dia do sacrifício .....	45
Figura 10 –	Fotografia do aparelho LUNAR DXA (Lunar, Wisconsin, USA) .....	47

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico1A	Evolução da massa corporal das fêmeas.....	56
Gráfico 1B	Comprimento corporal das fêmeas.....	56
Gráfico 2A	Evolução da massa corporal dos machos.....	57
Gráfico 2B	Comprimento corporal dos machos.....	57
Gráfico 3A	Evolução da ingestão alimentar das fêmeas.....	58
Gráfico 3B	Evolução da ingestão alimentar dos machos.....	58
Gráfico 4A	Ingestão calórica das fêmeas.....	59
Gráfico 4B	Ingestão calórica dos machos.....	59
Gráfico 5A	Índice de adiposidade das fêmeas.....	62
Gráfico 5B	Índice de adiposidade dos machos.....	62
Gráfico 6A	Morfologia dos adipócitos retroperitoneal das fêmeas.....	63
Gráfico 6B	Área e Número de adipócitos/100 $\mu\text{m}^2$ dos adipócitos retroperitoneal das fêmeas.....	63
Gráfico 6C	Morfologia dos adipócitos retroperitoneal dos machos.....	63
Gráfico 6D	Área e Número de adipócitos/100 $\mu\text{m}^2$ dos adipócitos retroperitoneal dos machos.....	63
Gráfico 7A	Morfologia dos adipócitos subcutâneo das fêmeas .....	64
Gráfico 7B	Área e Número de adipócitos/100 $\mu\text{m}^2$ subcutâneo das fêmeas....	64
Gráfico 7C	Morfologia dos adipócitos subcutâneo dos machos.....	64
Gráfico 7D	Área e Número de adipócitos/100 $\mu\text{m}^2$ subcutâneo dos machos....	64
Gráfico 8A	Teste de tolerância à glicose das fêmeas exposição.....	66
Gráfico 8B	Teste de tolerância à glicose das fêmeas abstinência.....	66
Gráfico 8C	Área da curva das fêmeas.....	66
Gráfico 9A	Teste de tolerância à glicose dos machos exposição.....	67
Gráfico 9B	Teste de tolerância à glicose dos machos abstinência.....	69
Gráfico 9C	Área da curva dos machos.....	69
Gráfico10	Concentração plasmática de insulina das fêmeas.....	69
Gráfico11	Concentração plasmática de insulina dos machos.....	70
Gráfico12A	Atividade superóxido dismutase (SOD) fêmeas .....	74
Gráfico12B	Atividade superóxido dismutase (SOD) machos .....	74

Gráfico13A	Atividade da catalase fêmeas .....	75
Gráfico13B	Atividade da catalase machos .....	75
Gráfico14A	Atividade glutaciona peroxidases (GPx) fêmeas .....	76
Gráfico14B	Atividade glutaciona peroxidases (GPx) machos .....	76
Gráfico15A	Determinação por TBARS fêmeas .....	77
Gráfico15B	Determinação por TBARS dos machos.....	77
Gráfico16A	Determinação da carbonilação proteica fêmeas .....	78
Gráfico16B	Determinação da carbonilação proteica dos machos.....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Avaliação corporal por DXA em fêmeas e machos.....	60
Tabela 2 –	Massa dos tecidos em fêmeas e machos.....	61
Tabela 3 –	Medidas ósseas em fêmeas e machos.....	65
Tabela 4 –	Índices de HOMA das fêmeas.....	70
Tabela 5 –	Índices de HOMA dos machos.....	71
Tabela 6 –	Avaliações plasmáticas em fêmeas e machos.....	72
Tabela 7 –	Conteúdo hepático de colesterol e triglicerídeo.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA –	Análise de Variância
INU –	Instituto de Nutrição
CO –	Monóxido de Carbono
CO <sub>2</sub> –	Gás Carbônico
TG –	Triglicerídeos
TNF- $\alpha$ –	Fator de necrose tumoral alfa
SOD –	Superóxido dismutase
MDA–	Malondialdeído
GPx–	Glutathione Peroxidases
CAT–	Catalase
↑–	Aumentado
↓–	Diminuído
TAR–	Tecido Adiposo Retroperitoneal
INCA–	Instituto Nacional do Câncer
WHO–	WORLD HEALTH ORGANIZATION

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>TABAGISMO</b> .....	17
1.1	<b>Definição</b> .....	17
1.2	<b>Histórico</b> .....	17
1.3	<b>Epidemiologia</b> .....	18
1.4	<b>A mola mestra do tabagismo: nicotina</b> .....	20
1.5	<b>Fumaça de cigarro</b> .....	22
1.6	<b>Tabagismo e adolescência</b> .....	24
1.7	<b>Tabagismo e Mulheres</b> .....	26
1.8	<b>Tabagismo e homens</b> .....	28
2	<b>TECIDO ADIPOSEO</b> .....	29
2.1	<b>Características gerais</b> .....	29
2.2	<b>Distribuição</b> .....	31
2.3	<b>Tecido adiposo: um órgão secretor</b> .....	33
2.4	<b>Adiposidade e Tabagismo</b> .....	35
2.5	<b>Adolescência + Fumo = Dano Celular / Estresse Oxidativo?</b> .....	36
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	40
4	<b>OBJETIVO</b> .....	41
4.1	<b>Objetivos específicos</b> .....	41
5	<b>METODOLOGIA</b> .....	42
5.1	<b>Animais</b> .....	42
5.2	<b>Determinação da puberdade</b> .....	42
5.2.1	<b>Fêmeas</b> .....	42
5.2.2	<b>Machos</b> .....	43
5.3	<b>Delineamento experimental</b> .....	43
5.4	<b>Avaliação de massa e de comprimento corpóreos</b> .....	46
5.5	<b>Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI)</b> .....	46
5.6	<b>Avaliação da composição corporal por DXA</b> .....	46
5.7	<b>Coleta de tecidos</b> .....	47
5.8	<b>Avaliação da ingestão alimentar e ingestão calórica</b> .....	48

5.8.1	<u>Ingestão alimentar diária</u> .....	48
5.8.2	<u>Ingestão calórica</u> .....	48
5.9	<b>Dosagens plasmáticas</b> .....	49
5.9.1	<u>Lipídios</u> .....	49
5.9.2	<u>Hormônios</u> .....	49
5.9.3	<u>Metabólito da nicotina</u> .....	49
5.10	<b>Avaliação da homeostasia: Índice de HOMA</b> .....	50
5.11	<b>Análise do conteúdo de triglicérideo e colesterol hepáticos</b> .....	50
5.12	<b>Índice de adiposidade</b> .....	51
5.13	<b>Processamento histológico de tecido adiposo e análise morfológica</b> .....	51
5.14	<b>Medidas ósseas</b> .....	52
5.15	<b>Avaliações de dano celular causado por estresse oxidativo em tecido adiposo retroperitoneal</b> .....	52
5.15.1	<u>Atividade das enzimas antioxidantes</u> .....	52
5.15.2	<u>Ensaio pró-oxidantes</u> .....	53
5.16	<b>Análise estatística</b> .....	54
6	<b>RESULTADOS</b> .....	56
6.1	<b>Evolução da massa e do comprimento corporal das fêmeas</b> .....	56
6.2	<b>Evolução da ingestão alimentar das fêmeas e machos</b> .....	58
6.3	<b>Ingestão calórica de fêmeas e machos</b> .....	59
6.4	<b>Avaliação da composição corporal por DXA de fêmeas e machos</b> .....	60
6.5	<b>Massa dos Tecidos de Fêmeas e Machos</b> .....	61
6.6	<b>Índice de adiposidade em fêmeas e machos</b> .....	62
6.7	<b>Morfologia e morfometria do tecido adiposo retroperitoneal das fêmeas e dos machos</b> .....	63
6.8	<b>Morfometria e morfologia do tecido adiposo subcutâneo das fêmeas e dos machos</b> .....	64
6.9	<b>Medidas ósseas: fêmur e coluna vertebral</b> .....	65
6.10	<b>Indicadores glicêmicos em fêmeas</b> .....	66
6.10.1	<u>Teste de tolerância à glicose em camundongos fêmeas e machos</u> .....	66
6.10.2	<u>Concentração plasmática de Insulina das fêmeas e machos</u> .....	68
6.10.3	<u>Índices de HOMA das fêmeas e machos</u> .....	70



6.11	<b>Avaliações plasmáticas em fêmeas e machos.....</b>	74
6.12	<b>Indicadores da integridade/dano do tecido adiposo retroperitoneal provocado por estresse oxidativo.....</b>	74
6.12.1	<u>Quantificação das enzimas anti-oxidantes.....</u>	74
6.12.2	<u>Atividade da catalase das fêmeas e machos.....</u>	75
6.12.3	<u>Atividade glutationala peroxidases (GPx) das fêmeas e machos.....</u>	76
6.12.4	<u>Quantificação de metabólitos determinantes da peroxidação.....</u>	77
6.12.4.1	<u>Determinação da peroxidação lipídica, pelo método de TBARS.....</u>	77
6.12.4.2	<u>Determinação da carbonilação de proteínas.....</u>	78
7	<b>DISCUSSÃO .....</b>	79
	<b>CONCLUSÃO .....</b>	85
	<b>REFERÊNCIA .....</b>	86

## INTRODUÇÃO

O consumo de tabaco é uma das grandes pandemias de todos os tempos, sendo preocupante não apenas em adultos, mas, também em adolescentes. Os índices de tabagismo entre adolescentes do sexo masculino e, principalmente, do sexo feminino vêm crescendo e pouco se sabe os danos que esta droga causa nos organismos ainda jovens (INCA, 2014).

O tabagismo é um problema de saúde pública que envolve gastos com o elevado número de hospitalizações e, aumento precoce da mortalidade. Diversos estudos mostram que o uso de cigarros é um fator de risco que contribui para a menor qualidade de vida, alterações na composição corporal, aumento da incidência de doenças respiratórias podendo desencadear doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose. Alguns fumantes, no entanto, mantêm o consumo do cigarro com receio do ganho de peso corporal, sendo este, um fator para a recaída durante período de abstinência, principalmente, entre as mulheres. Para estimular e manter o consumo de cigarros as indústrias utilizam artifícios como, a criação de cigarros com sabores, o que atrai a curiosidade dos adolescentes (VIGITEL, 2014).

Programas de prevenção e tratamento do tabagismo vêm sendo intensificados e universalizados, mundialmente. Os benefícios de deixar de fumar são de longe maiores que os problemas ligados ao aumento de peso corporal, que pode vir a ocorrer com o abandono do hábito de fumar. Dessa forma, buscar a manutenção do peso corporal ou o emagrecimento por meio do tabagismo é procedimento errôneo e altamente nocivo à saúde.

# 1 TABAGISMO

## 1.1 Definição

O tabagismo é uma toxicomania, integrando o grupo dos transtornos mentais e comportamentais, caracterizada pela dependência psicológica do consumo de tabaco, doença causada pela dependência física e psicológica à nicotina (ERIKSEN, MACKAY, ROSS, 2013; INCA, 2014).

## 1.2 Histórico

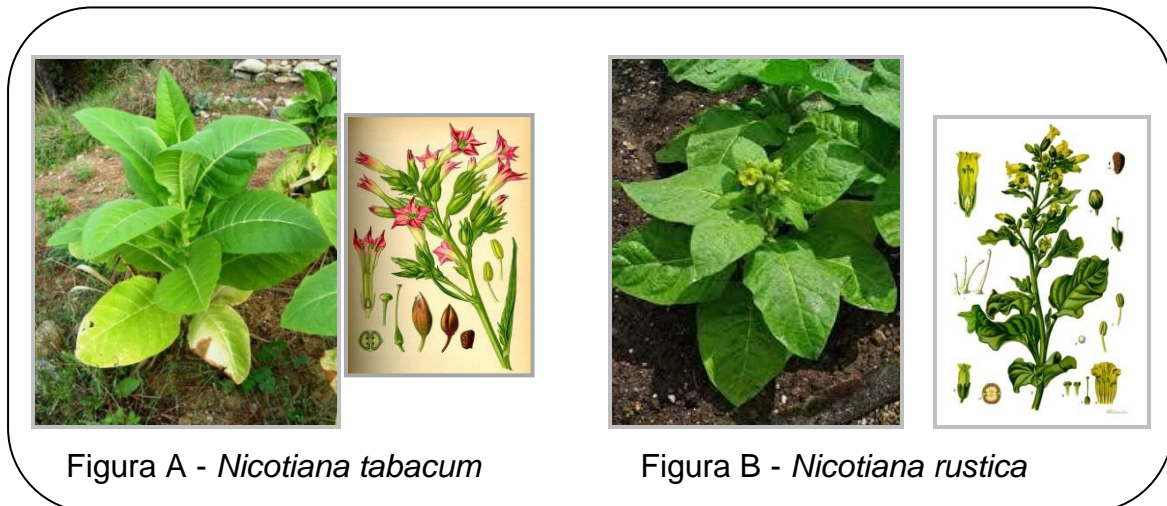
O tabaco, originário da América, ficou conhecido no “mundo civilizado” após da chegada de Colombo ao Continente, que percebeu o seu cultivo por toda a extensão. A partir daí, no século XVI, a planta (Figura 1) foi levada para a Europa e, em 1560, Jean Nicot introduziu o tabaco na corte francesa. Por ser utilizada como planta medicinal e de ornamentação do jardim foi denominado “nicotina”. O tabaco se espalhou rapidamente pela Europa, onde foi utilizado sob a forma de charuto (CORNEILLET, 1964; BRIDGES, COMBS, HUMBRE, 1990).

O cigarro surgiu em meados do século XIX na Europa. Na Espanha, porém, muito antes já se fumava tabaco enrolado em papel, denominado “papelete”. A primeira grande disseminação mundial do cigarro foi durante a Primeira Guerra Mundial, de 1914 a 1918, praticamente apenas entre os homens. Já a difusão entre as mulheres cresceu após a Segunda Guerra Mundial, onde o hábito de fumar estava associado a sair para o trabalho com independência, emancipação e patriotismo (WHO, 1992).

No Brasil, a história do fumo é anterior à chegada dos europeus. A planta, que deu origem o fumo, nasceu provavelmente nos vales orientais dos Andes bolivianos e se difundiu no atual território brasileiro através das migrações indígenas, sobretudo Tupi-Guarani. O fumo, para os índios brasileiros, tinha caráter sagrado semelhante à mandioca, o milho e muitas outras plantas de origem mística. O fumo era geralmente limitado aos ritos mágico-religiosos e como planta medicinal, reservado unicamente

aos pajés (HOUSTON, 2002; MUSK, 1987; ROSEMBERG, 2002; HECKERLING, 2009).

Figura 1 - Tipos de tabaco mais cultivados e usados



Fonte: <https://gobotany.newenglandwild.org>

### 1.3 Epidemiologia

A Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) considera o tabagismo como a principal causa de morte evitável, sendo, portanto, epidemia do tabaco uma das maiores ameaças à saúde pública que o mundo já enfrentou. Ele mata quase 6 milhões de pessoas por ano, dos quais mais de 5 milhões são de uso direto do tabaco e mais de 600.000 são não-fumantes expostos à fumaça. Uma pessoa morre a cada seis segundos devido ao tabagismo, o que representa uma em cada 10 mortes de adultos (WHO, 2015).

Cerca de 80% dos mais de um bilhão de fumantes no mundo vivem em países de renda baixa e média, onde a carga de doença e morte relacionadas ao tabaco é o mais pesado. Em 2014, o consumo de cigarros foi de cerca de 5,8 trilhões e, este consumo ainda está em ascensão. As reduções significativas nas taxas de tabagismo no Reino Unido, Austrália, Brasil e outros países que implantaram leis de controle ao consumo de cigarro foram compensadas pelo aumento do consumo em um único país, a China. O mercado chinês agora consome mais cigarros do que todos os outros países de baixa e média renda combinados. Outras regiões têm demonstrado maior crescimento no mercado de cigarros, como o

leste do Mediterrâneo, cuja taxa vem aumentando desde 2000. A África, devido ao recente desenvolvimento econômico, a manutenção do crescimento populacional e a falta de políticas de prevenção adequadas, apresenta o maior risco futuro em termos de consumo de tabaco e, conseqüentemente, a perda de milhões de vidas (THE TOBACCO ATLAS, 2014).

O padrão de consumo de cigarros varia entre os países, apresentando grandes disparidades e uma associação mais direta com o nível socioeconômico mais baixo, mesmo em países de baixa e média renda e também com o nível de escolaridade. A adoção de medidas de controle sobre o tabaco como, o aumento de impostos do cigarro, poderia ser direcionada ao financiamento de programas de prevenção e cessação ao tabagismo para os menos favorecidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014; INCA, 2014).

A epidemia do tabagismo se manifesta como uma verdadeira pandemia programada pela nicotina, considerada a sua principal propagadora. Em todas as áreas geográficas, o tabagismo é um hábito que atinge de forma geral homens e mulheres, com maior prevalência no sexo masculino. (ROSEMBERG, 2002). O percentual de adultos fumantes no Brasil vem apresentando uma expressiva queda na última décadas, cerca de 30,7%, em função das inúmeras ações desenvolvidas pela Política Nacional de Controle do Tabaco, incluindo o aumento no preço dos cigarros. Segundo os dados do VIGITEL de 2014, o percentual total de fumantes no Brasil era 10,8 % (INCA, 2015).

O levantamento de ex-fumantes no Brasil mostra a maior adesão entre os homens (21,2%) do que entre as mulheres (14,1%). Ressaltando que o percentual de abstinência aumenta intensamente com a idade, podendo chegar a 31% aos 60 anos de idade (INCA, 2014).

#### 1.4 A mola mestra do tabagismo: nicotina

A queima da folha do tabaco libera o seu principal componente, a nicotina ( $C_{10}H_{14}N_2$ ), uma amina terciária volátil cujo conteúdo varia de acordo com o tipo da planta (HENNINGFIELD; KEENAN, 1993).

A nicotina transportada pelo tabaco envolucrado no cigarro se espalhou pelo mundo (ROSEMBERG, 2002), se tornando a mola mestra da universalização do tabaco e o fator determinante do hábito de fumar (TAIOLLI; WYNDER, 1991). A nicotina é responsável pela dependência física e psíquica ao cigarro, gerando inicialmente sintomas como náuseas, vômitos, dores de cabeça, tosse, nervosismo, tonturas e insônia. Após várias tentativas de consumo, a repetição da exposição à nicotina sobre o cérebro desenvolve tolerância à droga, uma neuroadaptação (BALFOUR, FAGERSTROM, 1996; DOLL, CROFTON, 1996; PERKINS, 1993; BENOWITZ, ZEVIN, JACOB, 1998). A nicotina promove um rápido estado de alerta, melhorando a atenção, a concentração e a memória em animais adultos, além de diminuir o apetite, o que pode dificultar a manutenção da abstinência. Outro fator pelo qual os fumantes mantêm o hábito é a busca pelo alívio da ansiedade (HENNINGFIELD, KEENAN, 1993; HAXBY, 1995).

Diversos estudos sobre o metabolismo da nicotina demonstram que após a tragada, essa substância atinge o cérebro entre 7 e 19 segundos, o que pode ser um dos fatores para a manutenção do vício (BENOWITZ, et al., 1998). A nicotina age sobre o sistema mesolímbico – dopaminérgico, atingindo inclusive os neurônios dopaminérgicos do nigroestriado, centros como tálamo, hipotálamo, hipocampo, núcleo acumbens, córtex e tronco cerebral (ROSEMBERG, 1999). Estudos em animais e humanos relatam que ocorrem modificações no cérebro dos tabagistas, como o aumento do número e da densidade dos receptores nicotínicos em comparação com os não-fumantes, nas mesmas idades e do mesmo sexo (MARIANI et al., 1988).

O uso contínuo do tabaco pode gerar efeitos destrutivos ao organismo, causando o desenvolvimento de doenças pulmonares simples até alterações celulares, como cânceres, alterações cardíacas, vasculares e cerebrais (GILBERT, 1989; MELISKA; GILBERT, 1991). Alguns efeitos danosos ao sistema nervoso central (SNC) são causados em fumantes ativos e também persistem em não fumantes, por meio da exposição passiva a fumaça de cigarro, por promover

alteração na atividade sináptica colinérgica (ABREU-VILLAÇA; SEIDELER; SLOTKIN, 2003; SLOTKIN; COUSINS; SEIDLER, 2004).

Os efeitos da nicotina sobre o corpo incluem diminuição do apetite, elevação do humor, aumento da frequência cardíaca, aumento da pressão arterial, náuseas e diarreia. Os malefícios do tabagismo não atingem somente aos fumantes, mas, de forma ampla e danosa, atingem também toda a sociedade e o meio ambiente (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014).

Os diversos níveis de danos da nicotina estão baseados na forma de interação com o corpo. A combustão é o método mais eficiente e mais prejudicial de distribuição da nicotina no cérebro, por causa dos alcatroes e cancerígenos presentes (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, NICOTINE AND TOBACCO, 2014). A exposição aguda à nicotina através da pele ou através da ingestão também pode ser prejudicial. Se ingerida, a nicotina é rapidamente absorvida pelo intestino delgado, e normalmente produz sintomas entre 15 minutos e 4 horas após a exposição. A morte pode ocorrer dentro de uma hora de exposição severa. Numerosos casos de envenenamento por nicotina foram documentados desde o início do século XX, quando a nicotina foi usada como um pesticida (AMERICAN ASSOCIATION OF POISON CONTROL CENTERS, 2014).

O risco de dependência da nicotina depende da dose de nicotina entregue e o método no qual é fornecido. Há uma variedade de formas de consumir nicotina. Alguns métodos são atualmente regulamentados como cigarros de tabaco sem fumaça e terapia de reposição da nicotina. Por causa de sua dependência e os outros malefícios conhecidos da nicotina, é necessário um quadro para regular todos os sistemas de entrega de nicotina de uma maneira consistente com o dano que eles causam (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. NICOTINE AND TOBACCO, 2014)

Os sintomas de abstinência da nicotina incluem desejo intenso, ansiedade, depressão, dor de cabeça, aumento de apetite e dificuldade de concentração. É fato amplamente conhecido que os tabagistas quando abandonam hábito de fumar têm grande tendência a aumentar o peso corporal. Os fumantes têm aumento do dispêndio de energia com maior consumo de calorias influenciando o metabolismo lipídico, com redução de lipoproteínas de alta densidade (CHEN, 2007). Além de apresentarem diminuição na expressão hipotalâmica do Neuropeptídeo Y, importante estimulador do apetite (CHEN, 2006). Por outro lado, outros relatos revelaram que, embora os fumantes tenham em geral uns quilos a menos que os não-fumantes, eles apresentam má distribuição de gordura, sobretudo na região

pélvica. Esse padrão prejudica a conformação corporal e, é observado especialmente em mulheres adultas (SHIMOHAMA, MULLER, ANDRES, 1989; BROOKE, 1989; CHEN, et al, 2006).

O conteúdo de nicotina dos cigarros varia de 7- 9mg, entretanto, a absorção no organismo do fumante ativo varia de 0,1-10mg (BENOWITZ, et al., 1998). A nicotina sofre várias metabolizações e seus mais importantes metabólitos, quantitativa e qualitativamente, são a cotinina e o óxido-N-nicotina (BENOWITZ, et al., 1998; ROSEMBERG, 1999), sendo o primeiro, o marcador da exposição ao fumo. A cotinina pode ser avaliada na urina, no sangue e na saliva e tem meia vida de 36 à 40 horas, enquanto a nicotina tem meia vida de duas horas (ARAUJO, et al. 1988; CRESPI, et al. 1991).

### 1.5 Fumaça de cigarro

A toxicidade da fumaça de cigarro é determinada por um conjunto complexo de características do produto como a mistura do tabaco, os aditivos e inclusive o *design* (Figura 2). Este está relacionado à ventilação do filtro e a porosidade do papel, que são as principais partes do cigarro de papel (KOZLOWSKI; CONNOR; SWEENEY, 2001). Os estudos realizados em máquinas, para mimetizar a exposição à fumaça de cigarro em humanos, nem sempre refletem os reais valores de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono, pois, a absorção real desses compostos depende do comportamento humano ao fumar, tal como a intensidade em puxar a fumaça do cigarro e o tempo da tragada (HAMMOND, et al. 2006).

A fumaça do cigarro sai via boca do tabagista, durante a tragada (puffing), é chamada “via principal da fumaça de cigarro”, no inglês é denominada “cigarette mainstream smoke”. Nesta via, a fumaça sai do cigarro e é inalada diretamente para o sistema respiratório. Já a “via secundária da fumaça de cigarro”, denominada “sidestream smoke” é, sobretudo, a fumaça emergente do ambiente a partir do cigarro aceso e inalada através do nariz. A fumaça exalada da via principal e a fumaça da via secundária (difusa na atmosfera) tornam-se diluídas no ar e, após várias alterações físicas e químicas, incluindo reações com substâncias químicas não geradas pelo tabaco, tornam-se AFT (Ambiente com Fumaça de Tabaco), no inglês denominado “Environmental Tobacco Smoke”.

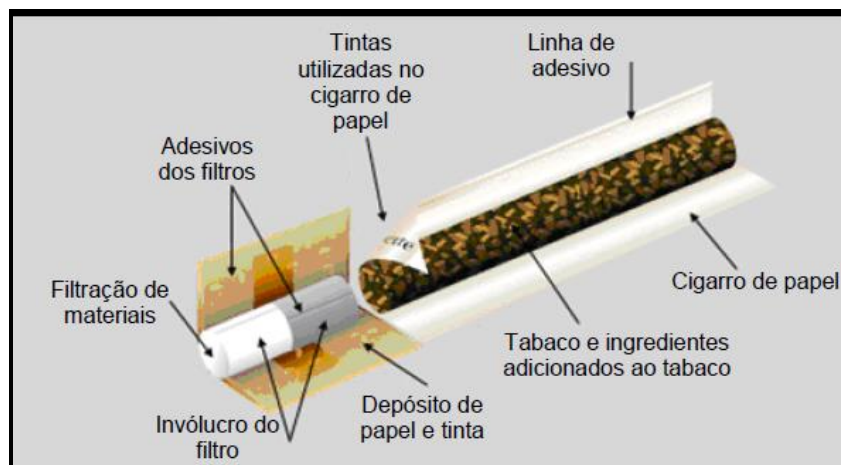


A fumaça inalada por fumantes possui um grupo complexo de compostos que podem estar suspensos no interior de uma mistura de gases de combustão (CO, CO<sub>2</sub>, etc.), na forma de aerossol ou ainda podem se apresentar na forma de compostos semivoláteis. Esses compostos podem ser classificados por fases. A fase alcatrão é representada pelas gotículas líquidas ou partículas. A fase vapor é composta pelos gases de combustão e gases semivoláteis, contém compostos citotóxicos que inclui carbonílicos e aldeídos reativos, os quais são capazes de danificar as células e induzir a inflamação pulmonar. E, a fase particulada que é mutagênica e citotóxica, capaz de promover a formação de tumores em modelos animais. Algumas evidências sugerem que a inflamação pulmonar induzida pela fumaça de cigarro pode desempenhar um papel importante no aumento de risco do câncer de pulmão em fumantes. Uma relação entre a inflamação pulmonar e câncer de pulmão, é mecanicamente plausível. As células inflamatórias secretam espécies reativas de oxigênio, mediadores inflamatórios e enzimas proteolíticas, as quais, tanto podem danificar DNA quanto aumentar as taxas de proliferação de reparo celular (SMITH, PERFETTI, KING, 2006).

Antes de ser inalada pelo trato respiratório a fumaça da via principal, que representa de 15% a 43%, é misturada às partículas do AFT. Assim como, 1% a 13% da fase de vapor é inalada com a fumaça proveniente da via secundária (BAKER; ROBINSON, 1990; EATOUGH; HANSEN; LEWIS, 1990; GUERIN; JENKINS; TOMKIS, 1992; BORGERDING; KLUS, 2005).

Os cigarros eletrônicos, também conhecidos como sistemas de entrega de nicotina eletrônicos, foram introduzidos no mercado por empresários chineses em 2004. No entanto, sua utilização despertou controvérsia ao longo da última década. Pois, embora a imitação, em *design*, dos cigarros tradicionais seja assumida como "mais segura" para ajudar o fumante a parar, a forma como se absorve a nicotina com o cigarro eletrônico e as consequências sobre a saúde não estão estabelecidas. Este desconhecimento, ainda não permitiu determinar a forma como esses cigarros devem ser regulamentados (HERZOG; GERBERI; SCOTT, 2014).

Figura 2 - Estrutura do cigarro de papel.



Fonte: Adaptado de Philip Morris International 2009

As empresas alegam que e-cigarros são menos prejudiciais do que os produtos tradicionais e reconhecem o potencial desse mercado em crescimento. No entanto, outros estudos são necessários para esclarecer os efeitos dos cigarros eletrônicos e suas consequências em longo prazo. O uso indiscriminado do e-cigarro causa preocupação para saúde pública posto que, pode induzir a normalização do fumo, atrasar ou impedir tentativas de cessação, promover o uso durante a juventude e facilitar o retorno ao vício para ex-fumantes dependentes da nicotina. Por outro lado, muitos acreditam que os e-cigarros representam a melhor esperança para uma tecnologia disruptiva que pode acabar com o fumo tradicional, salvando milhões de vidas. (MANGAN, 2014);

## 1.6 Tabagismo e adolescência

A maioria dos fumantes regulares começa a fumar antes dos 20 anos de idade. O fumo pode acompanhar uma série de trajetórias de desenvolvimento para a idade adulta e ser um dos responsáveis por aproximar os jovens de outras drogas que causam danos à saúde. Por isso, a nicotina é considerada por muitos como a “porta de entrada” para o uso de drogas ilícitas (AUDRAIN- MCGOVERN et al, 2004; O'LOUGHLIN et al, 1998; DIFRANZA et al, 2000).

Fabricantes de produtos derivados de tabaco desenvolvem estratégias diversas para aliciar jovens e com isso repor o seu mercado consumidor. A imagem do cigarro como “fruto proibido” estimula o desejo de “transgredir”, visto como uma

maneira de se afirmar como adulto e de se firmar num grupo social. Em razão do seu modo de ser e das suas formas de se comportar, os adolescentes tornam-se mais vulneráveis às estratégias da indústria tabagista e à publicidade (ERIKSEN, MACKAY, ROSS, 2013).

A juventude pode ter várias razões para iniciar o uso do tabaco, incluindo a procura 'cool', 'maduro', ou 'sociável', ou acreditar que o uso do tabaco é bom para lidar com o estresse e controle de peso. Os fatores que aumentam a iniciação de jovens ao tabagismo podem variar de país para país, mas alguns são comuns como: uso do tabaco pelos pais ou colegas; exposição à publicidade do tabaco; aceitabilidade do uso do tabaco entre os pares ou em normas sociais anunciados em filmes ou comerciais de tabaco; ter depressão, ansiedade ou stress; e maior acessibilidade e preços mais baixos de produtos do tabaco (AMROCK, GORDON, ZELIKOFF, 2014). Tendo em conta que o consumo na adolescência vem aumentando, esse dado tem recebido atenção considerável nos últimos anos (PATTEN, MARTIN, OWEN, 1996).

No Brasil, a legislação proíbe vender, fornecer ou entregar, à criança ou ao adolescente, produtos cujos componentes possam causar dependência física ou psíquica e, ainda restringe o uso e a propaganda de produtos fumíferos e obriga a advertência sobre os malefícios do fumo, proibindo a venda a menores de 18 anos (Brasil Lei nº 8.069, 1990; Lei nº 10.702, 2003). Em vários países, a idade mínima legal para a venda de produtos do tabaco é 21 anos, o que é mais eficaz na redução da exposição dos jovens aos produtos do tabaco (WHO, 2014).

Começar a fumar na adolescência está associado à dependência química que irá se estender por muitos anos (CHEN; MILAR, 1998; PIERCE et al., 1996). Esta associação tem influências na fase em que o adolescente incorpora a formação da personalidade, da consciência crítica e a construção da auto-estima, com grandes influências ambientais e sociais (INCA, 2015).

A ação imediata da nicotina em adolescentes influencia a função colinérgica induzindo alterações persistentes, que se refletem na dependência, aprendizado e memória (SARGENT; DI FRANZA, 2003). Ainda produz rápida alteração no sistema noradrenérgico e dopaminérgico nos centros nervosos cerebrais (JENIFER et al., 2001). O tabagismo ocasional entre adolescentes se assemelha a adultos que fumam diariamente, em vários aspectos como, atitudes em relação ao tabagismo e motivação para deixar de fumar (CARPENTER et al, 2009). Para alguns adolescentes, os sintomas iniciais da dependência podem aparecer logo após a

iniciação ao tabagismo (DIFRANZA et al., 2007; KANDEL; GRIESLER; SCHAFFRAN, 2007).

Adolescentes fumantes têm duas vezes mais dificuldade de deixar de fumar que os tornados tabagistas depois de 20 anos (BAKER; ROBINSON, 1990). Aos 19 anos de idade, mais de 90% dos jovens que deram início ao consumo de cigarros por volta dos 14 anos, já estão dependentes da nicotina (BRESLAU; KILBEY; ANDRESKI, 1993; TAIOLI; WYNDER, 1991). Por isso, a OMS considera o tabagismo uma doença pediátrica provocada pela nicotina (INCA, 2015).

No Brasil, a última pesquisa realizada com jovens estudantes de 17 cidades demonstrou uma prevalência similar entre estudantes e adultos fumantes regulares (BRASIL, 2015).

### **1.7 Tabagismo e Mulheres**

O tabagismo crescente entre as mulheres trouxe uma nova preocupação para a saúde pública, dados prejuízos à saúde da mulher e o aumento das doenças tabaco-relacionadas. Atualmente, elas representam cerca de 20% dos fumantes no mundo, ou seja, quase 250 milhões de tabagistas. Diversos aspectos envolvem a iniciação, o reforço e a manutenção do uso do cigarro entre as mulheres como as condições econômicas, o estresse provocado pela dupla jornada de trabalho, pela desigualdade de oportunidades de trabalho e salariais, pela violência doméstica ou mesmo por questões estéticas impostas pelos padrões de beleza vigentes na sociedade atual. (BRASIL. Ministério da Saúde, 2015)

A indústria do tabaco tenta associar o fumo aos direitos da mulher, igualdade de gênero, glamour, sociabilidade, diversão, sucesso e magreza. Usa estratégias para promover a aceitação social do tabagismo entre as mulheres, incluindo desenvolvimento de produtos com sabores e aromas, design diferenciado, publicidade, participação em programas de responsabilidade social e, usando a influência de mídia popular (BORDIN, 1993). A taxa de tabagismo em mulheres diminuiu significativamente entre 1980-2013 em vários países de alta renda da Oceania e da Europa, onde a prática é mais comum do que nos países de baixa e média renda. Na América do Norte a taxa caiu cerca de 50%, no entanto, na maioria dos países sul-americanos não ocorreram mudanças significativas. Na maioria dos

países asiáticos e africanos o tabagismo tradicional é comum, enquanto no sul da Ásia o tabagismo sem fumaça é mais utilizado. (WHO, 2015)

O fumo tem sido um meio, especialmente, utilizado pelas mulheres com a finalidade de perder ou controlar o peso. Fumar não oferece quaisquer benefícios ao controle de peso nos jovens, particularmente em mulheres, embora tenha uma associação negativa com o índice de massa corporal em adultos. Estudo relata que o índice de massa corporal (IMC) em homens (0,9kg/m<sup>2</sup>) e mulheres (0,6Kg/m<sup>2</sup>), ao parar de fumar é menor do que em não fumantes homens (2,1KG/m<sup>2</sup>) e mulheres (1,6Kg/m<sup>2</sup>). Isso pode ter um efeito sobre a recaída e retorno ao consumo de cigarros. Apesar da consciência dos efeitos prejudiciais à saúde, muitas pessoas preferem fumar, pela crença de que o cigarro pode ajudar a controlar o peso corporal (FULKERSON, FRENCH, 2003; WEE et al, 2001). Dieta saudável e exercício físico têm se mostrado maneiras mais eficientes e menos prejudiciais para o controle de peso ou obesidade, com benefícios adicionais de bem estar geral (PIGEYRE, DUHAMEL, POULAIN, 2012).

Mulheres fumantes tem redução na taxa de fertilidade de 75% para 57%, em razão do efeito causado pela concentração de nicotina no fluído folicular do ovário. Durante a gravidez, o fumo traz sérios riscos para a saúde da mulher e do feto podendo desencadear placenta prévia, ruptura prematura das membranas, descolamento prematuro da placenta, hemorragia no pré-parto, parto prematuro, aborto espontâneo, crescimento intrauterino restrito, má-formação fetal, abortamentos, mortalidade materna, natimortalidade e mortalidade neonatal, baixo peso ao nascer, morte súbita do recém-nascido e, comprometimento do desenvolvimento físico da criança. Um único cigarro fumado por uma gestante é capaz de acelerar os batimentos cardíacos fetais, devido aos efeitos da nicotina e do monóxido de carbono sobre o aparelho cardiovascular do feto (YAMAGUCHI, 2008).

Durante o aleitamento, a nicotina é transferida para o leite, podendo acarretar a intoxicação da criança, que apresentará com agitação, vômitos, diarreia e taquicardia. As crianças fumantes passivas apresentam uma grande chance de contrair problemas respiratórios (bronquite, pneumonia, bronquiolite) cujo agravamento pode ser proporcional ao número de fumantes no domicílio (ROSEMBERG, 2004).

## 1.8 Tabagismo e Homens

Mundialmente, quase um terço dos homens com idade acima de 15 anos é de fumantes. Nos últimos 30 anos, a média diária de fumo diminuiu aproximadamente 10%. No entanto, a prevalência do tabagismo entre homens varia, desde uma redução de 24% no Canadá, ao aumento de 16% no Cazaquistão, refletindo o incremento ao tabagismo principalmente nas regiões sul e central da Ásia, Europa Oriental e África. A Indonésia, com mais de 50 milhões de fumantes diários, ocupa a terceira posição mundial em número de fumantes do sexo masculino. A manutenção das atuais tendências tabagísticas, sem políticas de controle, levará a África a aumentar de 16% (em 2010) para 22% a prevalência de fumantes em 2030, a maioria homens. Enquanto na China, que detém atualmente, um terço dos fumantes do sexo masculino, programas de controle do tabaco foram recentemente estabelecidos, podendo reduzir cerca de 40% as taxas de tabagismo e manter em torno de 12,7 milhões de vidas até 2050 (MENDEZ, ALSHANQEETY, WARNER, 2013; LI et al, 2014; LEVY, RODRIGUEZ-BUNO, HU, 2014).

## 2 TECIDO ADIPOSEO

### 2.1 Características gerais

O tecido adiposo é classificado em dois tipos: o tecido adiposo unilocular e o tecido adiposo multilocular.

O tecido multilocular é denominado gordura marrom em virtude de sua coloração parda, que é determinada pela rica vascularização e presença de grande quantidade de citocromos presentes nas mitocôndrias. As células do tecido adiposo marrom são menores que as do tecido adiposo branco, têm forma poligonal e formam massas compactas semelhantes a glândulas endócrinas. Além disso, estas células são carregadas de gotículas lipídicas no seu citoplasma e têm numerosas mitocôndrias. Os depósitos de tecido adiposo marrom estão praticamente ausentes em humanos adultos, mas são encontrados em fetos e recém-nascidos e também em roedores. O tecido adiposo marrom é especializado na produção de calor (termogênese) e, portanto, participa ativamente na regulação da temperatura corporal. Atua essencialmente na produção de calor em recém nascidos, no desenvolvimento do estado febril e na hibernação dos mamíferos (LONCAR, 1991; CINTI, 2001; CINTI, 2002; SELL; DESHAIES; RICHARD, 2004; FONSECA-ALANIS et al., 2006, RAVUSSIN; GALGANI, 2011).

Mais recentemente, foi identificado um novo subtipo o tecido adiposo – bege, em seres humanos e roedores. Mas, não há evidências de que este pode ser, de fato, uma terceira forma de tecido adiposo. Similar aos adipócitos marrom, este subtipo é derivado de uma população de células progenitoras distintas, que reside no interior do tecido adiposo branco clássico (WU et al., 2012).

Os adipócitos brancos (Figura 4) são tipicamente esféricos, mas com frequência tornam-se poligonais devido à deformação mútua provocada pelo íntimo empacotamento das células. O tamanho celular pode variar de 20 a 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A característica morfológica predominante do adipócito branco maduro é sua grande inclusão lipídica, que ocupa 60 a 85% do peso do adipócito e é 90% constituída de TG. Todas as organelas intracelulares, inclusive o núcleo, são comprimidas em uma estreita faixa citoplasmática delimitada entre a inclusão lipídica e a membrana plasmática (FRUHBECK; GOMEZ-AMBROSI, 2001; HEIKKILÄ, 2002; HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004).

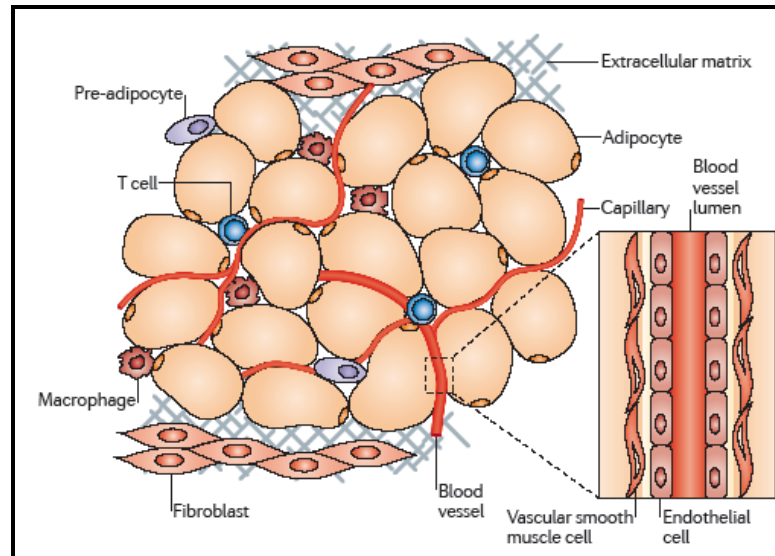
Outros tipos celulares contribuem para o seu crescimento e função, como: pré adipócitos, linfócitos, macrófagos, fibroblastos e células vasculares. Os macrófagos são abundantes no tecido adiposo visceral, estando este relacionado à resistência insulínica. Durante as fases iniciais de perda de peso, se acumulam provavelmente como resultado da lipólise. Os fibroblastos produzem componentes da matrix extra celular e, na disfunção metabólica o excesso de componentes produzido interfere com a expansão da massa de tecido adiposo. Portanto, evidenciando a necessidade da manutenção da comunicação intercelular para manter a função metabólica normal. As células T parecem estar envolvidas na regulação do fenótipo do macrófago (OUCHI et al., 2011)

Os adipócitos brancos são as únicas células especializadas na reserva de energia, que contribuem com a homeostase e a regulação dos fluxos de energia corporal (WARJCHENBERG, 2000). Possuem a maquinaria enzimática necessária para sintetizar ácidos graxos, processo denominado de lipogênese e estocar triglicerídeo em períodos de oferta abundante de energia e para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit energético. O sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático, atua diretamente sobre o tecido adiposo. O simpático promove ações catabólicas (lipólise), via estimulação  $\beta$ -adrenérgica que ativa a enzima lipase hormônio sensível (LHS). O parassimpático organiza as ações anabólicas por incrementar a secreção de insulina, aumentando a captação de glicose e de ácidos graxos (FRAYN; FIELDING; KARPE, 2005; FONSECA-ALANIS et al., 2006).

O tecido adiposo era tradicionalmente considerado um órgão de armazenamento de energia de longo prazo, mas, atualmente sabe-se que também tem um papel fundamental na integração do metabolismo sistêmico. Esta função metabólica é mediada, em parte, por sua capacidade de secretar uma variedade de proteínas com alto poder biológico, que atuam nos sistemas imunológico, cardiovascular, endócrino e no metabolismo. Coletivamente, fatores produzidos pelo tecido adiposo são referidos como adipocinas (OUCHI et al., 2011).



Figura 3 - Componentes do tecido adiposo



Fonte: (OUCHI et al., 2011).

## 2.2 Distribuição

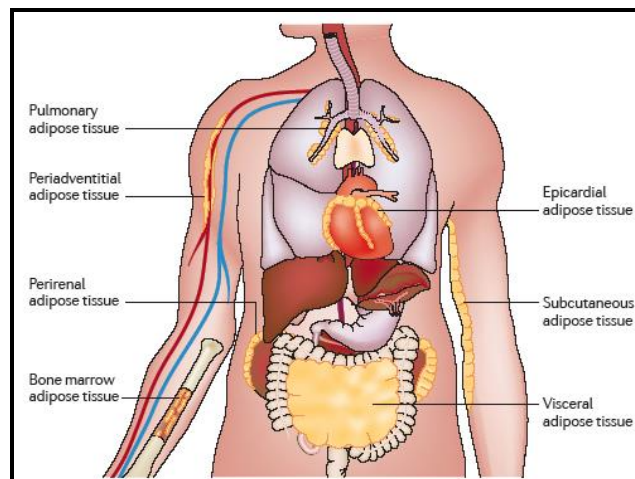
O tecido adiposo é distribuído em compartimentos (Figura 4), os quais diferem quanto à atividade metabólica e constitui um tecido de ampla e variada distribuição orgânica, cuja compartimentalização nem sempre apresenta conexão. Atua como reservatório energético, mas também como isolante térmico e protetor contra choques e traumas sobre os órgãos vitais (WAKI, TONTONOZ, 2007). Os dois e mais abundantes depósitos são os tecidos adiposos visceral e subcutâneo, os quais produzem adipocinas. Além disso, tecido adiposo também pode estar associado com múltiplos órgãos, incluindo coração, rins, medula óssea, pulmão e adventícia dos vasos maiores (OUCHI et al., 2011).

Os tecidos subcutâneo e visceral são grandes depósitos de adipócitos, distribuídos em vários órgãos tais como o coração, pulmão, e rim. Apresentam diferenças quanto a expressão de genes, hipertrofia e hiperplasia na obesidade (HARDY et al., 2012). O tecido adiposo subcutâneo tem uma elevada capacidade para a diferenciação dos adipócitos e expansão do tamanho da célula e armazenamento de grandes quantidades de triglicerídeos. Sua capacidade de armazenamento é um fator determinante para a redução da massa de tecido adiposo visceral e deposição de lípidios no fígado e no músculo. Em diabéticos obesos há uma incapacidade de converter o excesso de hidrato de carbono e lipídio para armazenamento no tecido adiposo subcutâneo, devido a diminuição da

expressão de genes como SREBP-1 e ChREBP (KURSAWE et al., 2013). Em contraste, o tecido adiposo visceral está diretamente relacionado com o risco de resistência à insulina e apresenta maior infiltração de monócitos e produção de IL-6 do que o tecido adiposo subcutâneo. Assim, corroborando para a indução da inflamação em indivíduos obesos (CANCELLO et al, 2006; FONTANA et al, 2007).

A distribuição da gordura nos homens e nas mulheres é desigual. Nos homens encontra-se em maior quantidade na região abdominal (tipo andróide ou maçã), enquanto nas mulheres localiza-se nas regiões do quadril e membros inferiores (tipo ginecóide ou pêra). Com o advento da menopausa, a mulher passa por uma transição, na qual ocorre a redistribuição da gordura para a região visceral, proporcionando uma característica andróide (LEY; LEES, 1992; WAKI; TONTONZOZ, 2007).

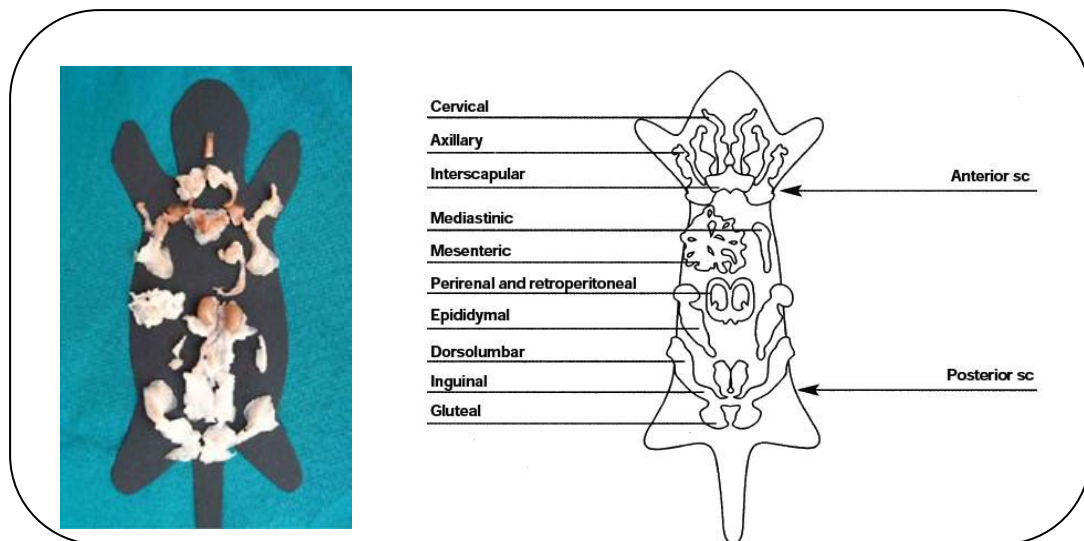
Figura 4 - Distribuição anatômica do tecido adiposo branco em humanos.



Fonte: OUCHI et al., 2011.

Em roedores (ratos e camundongos) a distribuição anatômica do tecido adiposo branco fica localizada nas regiões subcutânea e visceral (Figura 6). O depósito subcutâneo representa a porção anterior (cervical, axilar, intercapsular) e posterior (dorso-lombar, inguinal e gluteal). Já a gordura visceral é a mais compartimentalizada dentro da cavidade abdominal, compreendendo os depósitos visceral mediastino, intra-abdominal ou mesentérica, retroperitonal, perirenal, e epididimal (Figura 5).

Figura 5 - Distribuição anatômica do tecido adiposo branco em roedores.



Fonte: CINTI, 2001, 2002; CINTI 2004.

### 2.3 Tecido adiposo: um órgão secretor

A IL-6 (interleucina tipo 6), o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) e os componentes do sistema complemento B, C3 e D, também chamados de adipocinas, são moléculas com funções bem definidas nos estágios inflamatórios, e também produzidas em condições não-inflamatórias. Tanto TNF- $\alpha$  como IL-6 exercem um papel importante no metabolismo dos lípidios e da glicose, inibindo a lipoproteína lipase, induzindo a lipólise e aumentando a captação de glicose. Os níveis de IL-6, um marcador de resistência à insulina, estão aumentados na obesidade e diminuem com a perda de peso (TIIG, MOSCHEN, 2006). O fator C3, formado a partir dos fatores B e D, é precursor da molécula C3a. Esta, quando clivada forma a ASP (proteína estimuladora de acilação) que intervém na síntese e no armazenamento de triglicerídeos (COSTA, DUARTE, 2006). Outra importante molécula é o PAI-1 (inibidor de ativação do plasminogênio tipo 1), um inibidor da fibrinólise fortemente associado à obesidade. Relaciona-se, sobretudo, ao acúmulo de gordura visceral e ao risco cardiovascular, sugerindo uma relação entre obesidade e distúrbios trombóticos (RIBEIRO, FILHO, MARIOSIA, 2006; FRUHBECK, GOMEZ-AMBROSI, 2001).

Dentre os vários hormônios produzidos, a leptina foi o primeiro a ser descrito, em 1994. Sua secreção está relacionada com a proporção de tecido adiposo e com o estado nutricional. A leptina tem participação na regulação dos depósitos energéticos, da fertilidade e do sistema imunológico. Atua no hipotálamo, principalmente no núcleo arqueado, é capaz de se ligar aos seus receptores e

regular a ingestão de alimentos e/ou o gasto energético (WARJCHENBERG, 2000; REIDY, WEBER, 2000).

A resistina, secretada por monócitos e adipócitos, é uma proteína com propriedades pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6. Apesar de ser expressa e secretada em indivíduos magros, níveis elevados são associados à obesidade tanto em humanos como em modelos animais (STEPPAN et al., 2000; McTERNAN et al., 2003). A adiponectina, proteína expressa exclusivamente nos adipócitos, age como fator protetor para doenças cardiovasculares e aumenta a sensibilidade à insulina. (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; GIMENO; KLAMAN, 2005; WAKI; TONTONNOZ, 2007).

Dados sobre adipocinas são surpreendentes. A maioria estimula resposta pró-inflamatória e, sendo *upreguladas* pela obesidade, são indutoras de doenças metabólicas e cardiovasculares. Coletivamente, essas descobertas mostram que a disfunção metabólica decorrente do excesso da massa de tecido adiposo pode, em parte, resultar de um desequilíbrio na expressão de adipocinas pró- e anti-inflamatória, assim contribuindo para o desenvolvimento de complicações ligadas à obesidade (OUCHI et al., 2011).

## 2.4 Adiposidade e Tabagismo

O tabagismo é percebido como uma estratégia eficaz para o controle de peso para muitos fumantes. Aproximadamente 75% das mulheres e 35% dos homens relataram que não tolerariam um ganho de peso superior a 2,5 kg se parar de fumar (POMERLEAU, KURTH, 1996).

Uma explicação para a redução no peso corporal com o fumo do tabaco pode resultar da diminuição da ingestão calórica e/ou aumento do gasto de energia (WAGER-SRDAR et al, 1984; GRUNBERG, 1986). Tem sido relatado que o uso crônico de cigarro modifica o peso corporal por diminuir o apetite e/ou aumentar a taxa metabólica, promovendo aumento do metabolismo lipídico (PERKINS, 1993). O efeito supressor do apetite induzido pelo tabaco está relacionado à nicotina (CHEN et al, 2006). A manutenção da massa corporal é um fator que dificulta e até mesmo impede a adesão de fumantes à abstinência. Nos Estados Unidos, dos 40% de fumantes que tentam parar de fumar, apenas 6% conseguem se manter livres do fumo por longo prazo. Isto porque, a consequência imediata da abstinência é o ganho de massa corporal, sendo portanto, o fator determinante para a recaída e retorno ao tabagismo (FERRARA et al, 2001; CHEN et al, 2007).

Entre as mulheres jovens a redução da massa corporal e do apetite são os maiores motivadores para fumar cigarro. O ganho de massa imediatamente após a cessação de fumar está relacionado ao aumento das calorias, especialmente pelo consumo de alimentos ricos em gordura e açúcar, redução do gasto energético e aumento do acúmulo de lipídios. O fumo reduz lipoproteínas de alta densidade (HDL), aumenta concentração de triglicerídeos e marcadores pró-inflamatórios e pró-coagulantes (CHEN et al, 2007). Apesar de o fumo parecer um fator positivo para a adiposidade, está relacionado ao desenvolvimento da obesidade abdominal e central em humanos (CANOY et al, 2005). Assim, além de interferir no metabolismo, o fumo também é fator que aumenta o risco para o diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares.

Em estudos experimentais, a exposição à fumaça de cigarro por curto e longo prazo, desencadeou a diminuição da ingestão alimentar e do ganho de massa corporal acompanhados por menor massa de tecido adiposo branco. Esses efeitos foram induzidos pela redução hipotalâmica de neuropeptídeo Y, importante estimulador central do apetite (CHEN et al, 2006).

Estudos relatam que fumantes têm uma menor quantidade de gordura visceral do que os não-fumantes (MATSUSHITA et al. 2010). Nosso estudo anterior

(GASPAR-REIS, 2011), em modelo animal utilizando camundongos, corroborara com os resultados em humanos. Verificamos que a exposição à fumaça de cigarros também manteve o padrão de distribuição de tecido adiposo visceral e subcutâneo já descrito.

Assim como a obesidade, a utilização de cigarro/nicotina está aumentando em muitos países em desenvolvimento. Existe uma preocupação geral em relação a coexistência desses dois fatores de risco para distúrbios metabólicos, dado que alguns fumantes acreditam que fumar favorece a perda e/ou manutenção do peso corporal. Com isso, erroneamente, concluem que podem comer, sem qualquer tipo de controle ou restrição, enquanto fumam. No entanto, o que poucos sabem é que esta co-ocorrência, tabagismo e ganho de peso corporal, tem efeitos devastadores sobre a saúde e, está afetando os indivíduos em todo o mundo (CHIOLERO et al, 2008; FLEGAL et al, 2010).

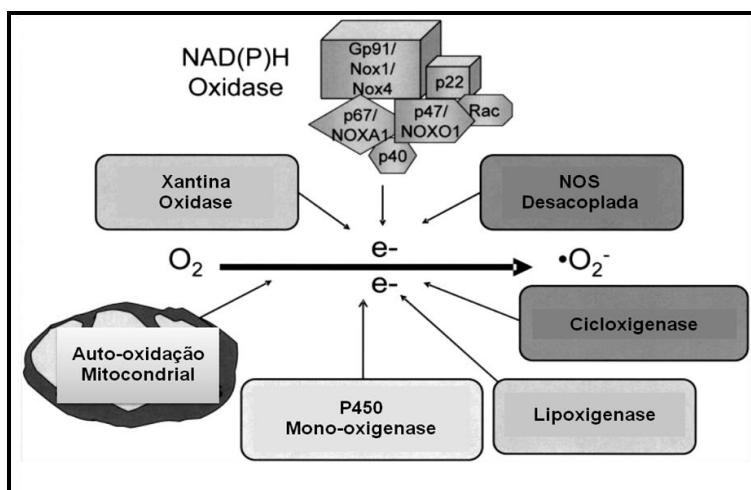
## **2.5 Adolescência + Fumo = Dano Celular / Estresse Oxidativo ?**

É sabido que hábitos não saudáveis como a ingestão de bebidas alcoólicas, a alimentação inadequada e uso do cigarro entre outros, são fatores agravantes da morte celular e conseqüente envelhecimento precoce, causado pelo estresse oxidativo. Esse resulta do desequilíbrio entre a formação excessiva de radicais livres (compostos oxidantes) ou da menor velocidade de sua remoção pelo sistema celular de proteção antioxidante. O estresse oxidativo leva à oxidação de biomoléculas, com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (BARBOSA et al, 2010).

A produção de radicais livres (Figura 6) – espécies reativas de oxigênio (ERO) - é contínua e, cumpre funções biológicas como parte de seus processos metabólicos. Os sítios celulares produtores de ERO são mitocôndrias, membranas e citoplasma. Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O<sub>2</sub>) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons (a principal fonte geradora de radicais livres). Os 10% - 15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, por reações químicas de oxidação direta. Portanto, em proporções adequadas possibilitam a geração de ATP, energia para a célula. No entanto, a produção excessiva e crônica implica na etiologia de várias enfermidades como

aterosclerose, diabetes mellitus, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer.

Figura 6 - Fontes enzimáticas de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). As principais enzimas responsáveis pela geração de EROs: NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, e NOS desacoplada.



Fonte: PARAVICINI & TOUYZ, 2008.

O oxigênio molecular tende a receber um elétron de cada vez devido à sua configuração eletrônica, e durante este processo forma compostos intermediários altamente reativos, destacando-se o  $O_2^{\cdot-}$ , o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) (BELLÓ, 2002). As EROs podem agredir os diferentes constituintes celulares causando dano em lipídios – peroxidação lipídica, em proteínas – oxidação proteica e, ao DNA. A membrana é o constituinte celular mais vulnerável uma vez que ela é formada por ácidos graxos insaturados e proteínas, levando a alterações na estrutura da membrana e na permeabilidade celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1992; MELLO FILHO *et al.*, 1984; KOHEN & NYSKA, 2002). Outros danos à proteínas são: a perda de atividade enzimática, alterações na função celular como produção de energia, interferência na criação do potencial de membranas, e mudanças do tipo e do nível da proteína celular. (DAVIES, 1987; HALLIWELL, 1999; KOHEN & NYSKA, 2002).

O mecanismo de ação dos antioxidantes compreende desde a remoção do oxigênio do meio, varredura das EROs ou seus precursores, inibição da formação das EROs, sequestro dos metais catalisadores da formação de radicais livres, aumento da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo (BELLÓ, 2002). O sistema enzimático representa a primeira linha de

defesa antioxidante do organismo e, é formado por diversas enzimas, destacando-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e tioredoxina. Os antioxidantes exógenos, não enzimáticos, geralmente são provenientes da dieta como o ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E) os bioflavonóides e outras pequenas moléculas (BARBOSA et al, 2010).

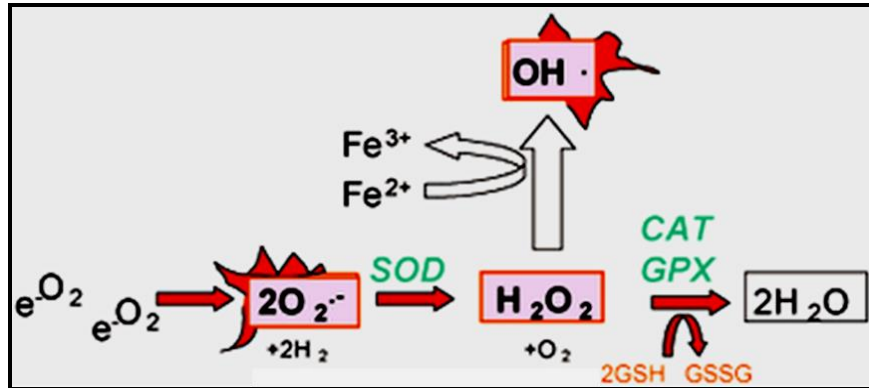
A SOD é responsável por catalisar a conversão de dois radicais  $O_2^{\cdot-}$ , que são altamente reativos, em  $H_2O_2$ , que é um pouco menos reativo, e  $O_2$  na presença do próton  $H^+$ . O  $H_2O_2$  é detoxificado pela CAT e pela GPx. (FRIDOVICH, 1995; PARAVICINI & TOUYZ, 2008; WOLIN, 2000).

A CAT, localizada nos peroxissomas e no citosol, impede a formação do radical hidroxil e consequente dano celular, pois reage eficientemente com  $H_2O_2$  e catalisa sua conversão em água e oxigênio ( $H_2O + O_2$ ). Possui atividade apenas para peróxidos de hidrogênio, de etila e de metila (CHANCE *ET AL.*, 1979), sendo muito efetiva em níveis altos de estresse oxidativo (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HECK *et al.*, 2010).

A GPx é uma enzima selênio-dependente que se encontra no citosol, na matriz mitocondrial e no meio extracelular em fígado, eritrócitos, coração, pulmão, músculo e tecido adiposo. Catalisa a redução do  $H_2O_2$  usando a glutathione, gerando água e hidroperóxidos em alcoóis estáveis. O metabolismo da glutathione é um dos mais essenciais mecanismos de defesa antioxidantes. (ESTERBAUER *ET AL.*, 1992; RIKANS & HORN BROOK, 1997). Vide Figura 7.



Figura 7 - Ação catalisadora das enzimas antioxidantes sobre os agentes reativos.



Fonte: PARAVICINI & TOUYZ, 2008

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio estão incluídas entre as 4 mil substâncias presentes na fumaça de cigarro e, estão relacionadas a efeitos deletérios aos lipídios e consequente aumento de marcadores da peroxidação lipídica – TBAR e MDA (PARK, PARK, GWAK et al.,1998; LYKKESELEDT, 2007; HU, ZHANG, YANG, 2007), assim como a oxidação de proteínas e do DNA. Dado interessante verificado em indivíduos fumantes foi a redução das concentrações plasmáticas de vitamina C e E (PARK, PARK, GWAK et al.,1998).

### **3 JUSTIFICATIVA**

Considerando o aumento do percentual de adolescentes tabagistas, surge a necessidade de se conhecer as alterações que organismos jovens podem apresentar durante e após a exposição ao tabaco. Estudos experimentais podem fornecer informações importantes, servindo como um instrumento auxiliar na educação antitabagismo e alertar para os efeitos prejudiciais sobre o desenvolvimento dos adolescentes.

## 4 OBJETIVO

Avaliar a influência do fumo na puberdade e da abstinência na vida adulta, sobre aspectos relacionados à composição corporal e à adiposidade de camundongos Swiss, fêmeas e machos.

### 4.1 Objetivos específicos

Avaliar as consequências da exposição à fumaça de cigarro e da abstinência, em camundongos fêmeas e machos sobre:

- o desenvolvimento corporal, através de medidas de massa corporal, comprimento corporal, dimensões ósseas, composição corporal e ingestão alimentar;
- a massa de tecidos adiposos intra-abdominal e subcutâneo, fígado, pulmão e tireóide;
- o conteúdo hepático de triglicerídeo e colesterol;
- a morfologia dos tecidos adiposos retroperitoneal e subcutâneo;
- a integridade de estrutura de moléculas de lipídios e proteínas no tecido adiposo retroperitoneal.

## 5 METODOLOGIA

Esse estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ - CEUA 030/2010.

### 5.1 Animais

Nesse estudo foram utilizados camundongos fêmeas (n= 48) e machos Swiss (n= 48), reproduzidas no biotério do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e Desenvolvimento, Depto Ciências Fisiológicas/IBRAG/UERJ. Os animais foram mantidos em gaiolas medindo 30 x 20 x 13 cm, sob temperatura controlada (25 a 27°C) e ciclo de claro - escuro de 12 horas (7:00 – 19:00h), com livre acesso à água filtrada e ração comercial (Nuvilab®).

Camundongos fêmeas de 3 meses de idade, foram acasaladas na proporção de 1 fêmea para 1 macho. Após a cópula, as fêmeas grávidas foram colocadas em gaiolas individuais até o desmame dos filhotes, os 21 dias, quando foram separados. Da prole, apenas uma fêmea e um macho da ninhada foram utilizadas, sendo organizados em gaiolas, contendo no máximo 5 animais.

### 5.2 Determinação da puberdade

#### 5.2.1 Fêmeas

Os camundongos fêmeas foram acompanhados diariamente a partir dos 21 dias de idade, para visualização da abertura vaginal e a partir daí submetidas à coleta de secreção vaginal para citologia, diariamente, até ao sacrifício. As amostras foram colhidas com auxílio de micro ponteiros plásticas, cuidadosamente,

introduzidas na vagina. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz em objetivas com aumento de 10x e 40x, (Zeiss, modelo Primo Star) sendo classificadas de acordo com as proporções dos tipos celulares encontrados em cada fase do ciclo estral (MARCONDES, 2002). Dentre os três tipos celulares encontrados no epitélio vaginal, foi considerado o primeiro estro do animal quando observado o primeiro lavado citológico com grande concentração de células queratinizadas. O início da ciclicidade foi estabelecido quando houve o aparecimento de um período iniciado e finalizado pela a fase proestro, num intervalo de seis dias. A observação de um segundo proestro é importante para indicar o final de um ciclo e início de outro (NELSON, 1990).

O início e acompanhamento da seqüência de ciclos estrais determinam o funcionamento das gônadas e indiretamente a ação dos hormônios esteróides sexuais, marcando a puberdade.

### 5.2.2 Machos

Para os machos o acompanhamento foi realizado pela idade, de acordo com a descrição da literatura (ABREU-VILLAÇA et al, 2003).

## 5.3 **Delineamento experimental**

Aos 35 dias de idade, as fêmeas e os machos foram submetidos à câmara de fumaça, onde foram divididos em dois grupos experimentais, constituídos, ao final, por 24 animais para cada grupo experimental. Após quinze dias de exposição, metade dos animais de cada grupo foi sacrificada para avaliação. A outra metade permaneceu em abstinência por trinta dias e então foram avaliados. Os grupos foram assim definidos: Cada grupo experimental foi constituído por 12 animais, avaliados imediatamente após a exposição à fumaça ou após um período de abstinência de 30 dias, formando os seguintes grupos:

- Controle (C, n=6): filhotes não expostos à fumaça avaliados após o período de exposição (idade 50 d);

- Fumantes 15dias (F/15, n=6): filhotes expostos à fumaça e avaliados após a exposição (idade 50 d);
- Controle (C/30, n=6): filhotes não expostos à fumaça avaliados 30 dias após o período de abstinência (idade 80 d);
- Ex fumantes (A, n=6): filhotes expostos à fumaça avaliados após 30 dias de abstinência (idade 80 d).

A exposição à fumaça de cigarro ocorreu por um período de 8 horas diárias, das 8:00 às 16:00h, durante 15 dias em uma câmara acoplada a uma máquina automática de queima dos cigarros e geração de fumaça (Figura 6). Exceto pelo 15º dia, no qual a exposição foi de 4 horas (ABREU-VILLAÇA, 2010). Foram utilizados cigarros do tipo 3R4F, produzidos para pesquisa científica, pela University of Kentucky (Cigarette Program, 2011), com concentração de 0,73 mg nicotina e 9,4mg alcatrão, por cigarro.

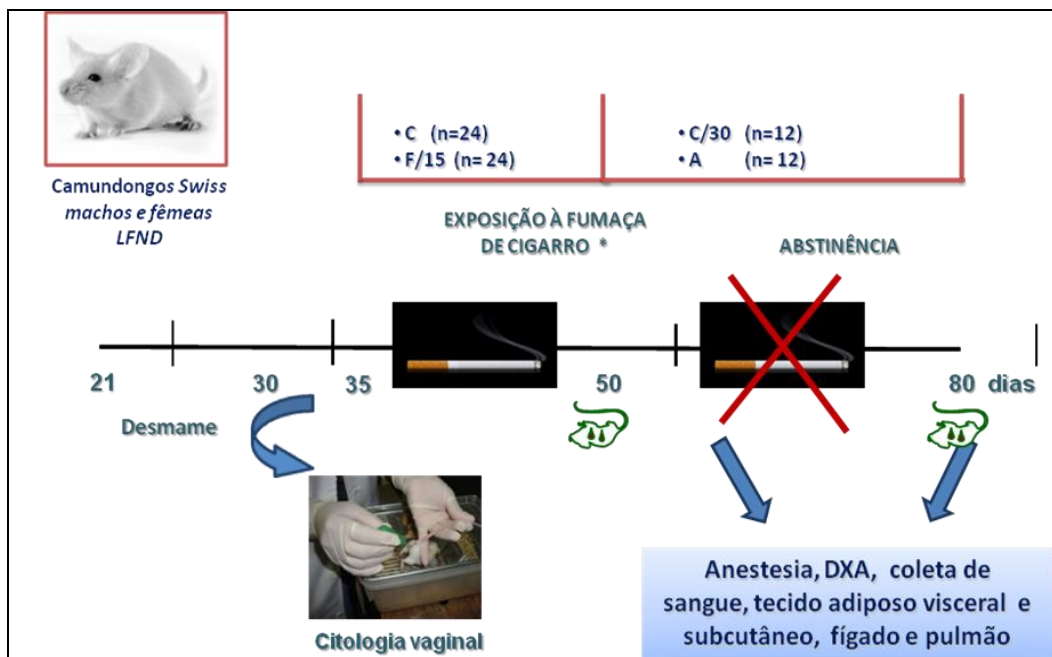
A mistura de fumaça continha 89% de fumaça secundária ou sidestream, e 11% de fumaça primária ou mainstream. Durante a exposição, as partículas totais suspensas foram mensuradas pela pesagem dos filtros de fibras de teflon (TX40H120-WW; Pallflex products Co, Putnam, CT). Antes e após um período de 5 minutos durante cada coleta de ar feita pela câmara, a quantidade de partículas totais suspensas foi de  $24 \pm 2,4 \text{ mg/m}^3$ .

Figura 8 - A) Máquina geradora de fumaça com câmara para acomodação das caixas de camundongos B) Câmara, sem fumaça, para o grupo controle.



Fonte: TeagueEnterprises, Davis, CA, 2016.

Figura 9 – Delineamento experimental do projeto desde o desmame até o dia do sacrifício.



Fonte: A Autora, 2016.

#### 5.4 Avaliação de massa e de comprimento corpóreos

A partir dos 21 dias, os filhotes foram pesados a cada 4 dias, até o final do período experimental, 80 dias de idade, utilizando-se Balança Filizola.

O comprimento naso-anal foi verificado com fita métrica (C&C®, Brasil) e aferido a cada 15 dias, dos 21 aos 80 dias de idade.

Ao final de cada período experimental, ou seja, final da exposição à fumaça ou após trinta dias de abstinência, os animais foram avaliados *in vivo*, para determinação da tolerância a glicose e para determinação da composição corporal por DXA e, em seguida foram sacrificados para coleta de tecidos e realização das demais análises.

#### 5.5 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI)

Na véspera do DXA os animais foram mantidos em jejum por 6 horas para a realização do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI). A primeira coleta de sangue, considerada o ponto inicial da curva (ponto 0, glicemia de jejum) foi realizada através de uma pequena incisão na cauda dos animais, permitindo mensurar a glicemia através de fitas reagentes e glicosímetro (ACCU-CHEK® Performa, Roche). Após a primeira coleta foi injetada solução de glicose (2g/kg PC), intraperitonealmente. Aos 30, 60, 90 e 120 minutos, após administração da solução de glicose, a glicemia foi avaliada e expressa em mg/dL.

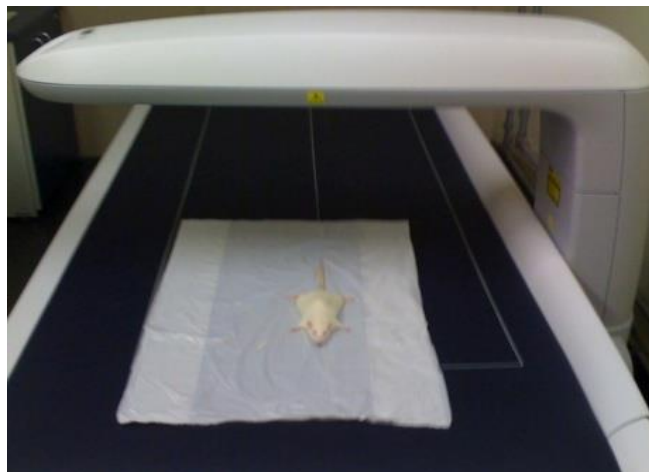
#### 5.6 Avaliação da composição corporal por DXA

Aos 50 e 80 dias de idade, os camundongos foram submetidos ao exame de Absorpciometria de Raios-X em Duas Energias (DXA, Lunar DXA 200368, GE Healthcare, Wisconsin, USA), no Instituto de Nutrição da UERJ, para a determinação da gordura corporal total (g), massa magra(g) e massa de gordura do tronco(g). Para tal, os animais foram anestesiados com Avertin® ((Tribromoethanol/0,02 ml/kg PC, i.p.) e colocados em decúbito dorsal sobre a maca



do aparelho. A análise das imagens foi executada pelo mesmo examinador, seguindo protocolo descrito previamente (LUKASKI et al, 2001; GLICKMAN et al, 2004).

Figura 10- Vista frontal do aparelho DXA Lunar200368, com camundongo na posição de decúbito dorsal.



Fonte: Instituto de Nutrição da UERJ, 2016.

## 5.7 Coleta de tecidos

Após a avaliação por DXA e sob anestesia os animais foram exsanguinados, utilizando seringa heparinizada.

O sangue foi centrifugado a 4°C, por 15 minutos, a 1590xg (Hitachi CR22, USA) e o plasma armazenado a -20°C para posterior análise.

O tecido adiposo retroperitoneal, mesentérico, epididimal e o tecido adiposo subcutâneo foi excisado conforme protocolo previamente estabelecido (FONSECA-ALANIZ, 2007). Também foram coletados o fígado, a tireóide e os pulmões. Todos os tecidos foram pesados em balança digital com precisão de 0,005 gramas.

Após a pesagem, o fígado foi congelado à - 80°C para análise do colesterol e triglicerídeo intra-hepáticos, enquanto o tecido adiposo retroperitoneal e subcutâneo foram colocados em frascos com formol tamponado para posterior processamento histológico.

A coluna vertebral e fêmur esquerdo foram coletados e armazenados a 20°C, para posterior análise.

## 5.8 Avaliação da ingestão alimentar e ingestão calórica

### 5.8.1 Ingestão alimentar diária

A ingestão de ração comercial foi acompanhada a partir do desmame. Durante a exposição à fumaça, o monitoramento foi diário e nos demais períodos de 4 em 4 dias, até os 80 dias de idade. A quantidade diária ingerida é calculada pela diferença entre a quantidade total oferecida ( $R_i$ ) e a quantidade que restou na gaiola após 4 dias ( $R_f$ ), dividida pelo número de dias ( $D$ ) e pelo número de animais da gaiola ( $N$ ). Durante a exposição, a avaliação da ingestão aconteceu a cada 24 horas, seguindo os mesmos princípios. O cálculo da ingestão de ração obedeceu à fórmula:

$$\text{Ingestão de ração(g)} = \frac{R_i - R_f}{D \cdot N}$$

### 5.8.2 Ingestão calórica

Calculada a partir da ingestão diária por animal multiplicada pela quantidade de kcal contida em cada grama de ração (TANNUS, 2005).

## 5.9 Dosagens plasmáticas

### 5.9.1 Lipídios

As dosagens plasmáticas triglicerídeos e colesterol foram realizadas em duplicata, por método colorimétrico, utilizando Kits comerciais (Bioclin®, BeloHorizonte/MG, Brasil). As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro (TU-1800, UV-VIS®, Columbia, MD, USA) e os resultados foram expressos em mg/dL.

### 5.9.2 Hormônios

Os ensaios para insulina e leptina foram realizados uma única vez, com amostras em duplicata, pelo método de radioimunoensaio (RIA), com Kit MP Biomedicals, Inc., CA, USA. A detecção da radioatividade foi efetuada em contador gamma (Gamma-C12, USA).

A insulina foi expressas em  $\mu\text{UI/mL}$ , sendo o coeficiente de variação intraensaio de 8,5% e o limite de sensibilidade de 1 mUI/ml.

### 5.9.3 Metabólito da nicotina

A cotinina (metabólito da nicotina) foi avaliada por método de ELISA utilizando o kit cotinina OraSure Technologies (Belém, PA), de acordo com as recomendações do fabricante. Sendo considerado o limite de detecção da técnica  $> 8 \text{ ng/ml}$ .

### 5.10 Avaliação da homeostasia: Índice de HOMA

Para determinar o grau de sensibilidade periférica à insulina (HOMA-IR) e a capacidade funcional da célula beta pancreática (HOMA- $\beta$ ) foi utilizado o Modelo de Avaliação da Homeostasia (Homeostasis Model Assessment – HOMA). O modelo matemático foi desenvolvido como uma forma alternativa de quantificar a resistência insulínica em humanos, mas vem sendo empregado também em estudos experimentais (COSTA et al, 2013). Para isso são utilizadas como variáveis a glicemia e a insulinemia de jejum (TURNER & HOLMAN, 1979; MATTHEWS et al, 1985). A glicemia de jejum é determinada no ponto 0 do TTGI.

O HOMA-IR é calculado a partir da multiplicação da concentração de insulina de jejum ( $\mu\text{UI/mL}$ ) pela glicose de jejum ( $\text{mmol/L}$ ) dividido por 22,5. Valores maiores que 1 representam um nível crescente de insulino- resistência.

O HOMA- $\beta$  é calculado a partir da concentração de insulina de jejum ( $\mu\text{UI/mL}$ ) multiplicada por 20, dividida por glicemia de jejum ( $\text{mmol/L}$ ) subtraído de 3,5. Os valores caracterizam hiposecreção ou hipersecreção de insulina.

### 5.11 Análise do conteúdo de triglicerídeo e colesterol hepáticos

Uma amostra de 50 mg de fígado, armazenada em  $-80^{\circ}\text{C}$ , foi utilizada para análise de triglicerídeo e colesterol hepáticos. As amostras de fígado foram homogeneizadas em 1 mL de álcool isopropílico, em processador ultrassônico. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, disposto em tubos do tipo eppendorff e foi adicionada solução reagente de triglicerídeo ou colesterol (kit Bioclin). A amostra foi agitada em vortex e mantida em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos (PEIXOTO-SILVA *et al*, 2014). A absorbância da amostra foi quantificada em espectrofotômetro e os resultados expressos em mg/dl por mg de tecido.

## 5.12 Índice de adiposidade

Calculado através da razão entre o gordura corporal total (somatório dos depósitos de gordura mesentérico e retroperitoneal) e a massa corporal final, multiplicado por 100, com o resultado apresentado em percentual (%). Este índice é utilizado como ferramenta para avaliar a quantidade de gordura corporal em roedores (LEVIN *et al*, 2000; CARROL, ZENEBE & STRANGE, 2006; BOUSTANY-KARI *et al*, 2007; LEOPOLDO, 2010).

## 5.13 Processamento histológico de tecido adiposo e análise morfológica

Amostras de tecido adiposo intraabdominal - coletadas da região retroperitoneal e, de tecido subcutâneo - coletado da região inguinal foram fixadas em formol tamponado 10%, por 72 horas. Posteriormente, o material foi desidratado em banhos de imersão em álcool absoluto e diafanizado em xilol. Em seguida, as peças foram impregnadas com parafina líquida (em estufa a 56°C) e incluídas em blocos de parafina. Os blocos de parafina prontos foram seccionados utilizando-se o micrótomo (Microtec-CUT 4050, SC, USA). As secções de 5µm foram coletadas em lâminas e então coradas com Hematoxilina-Eosina, segundo técnica de rotina.

Os cortes histológicos foram analisados por meio de um sistema microscópico computadorizado, composto por um microscópio óptico Olympus BX 40, cuja ocular é acoplada a uma câmera de vídeo Optronics 1-CCD, que transmite as imagens obtidas a um microcomputador. As imagens foram capturadas em formato TIFF, com tamanho 1360 x 1024 pixels. Essas imagens foram calibradas através da lâmina com régua graduada em dois milímetros divididos 10 em unidades de 0,01mm (dez micrômetros) para a objetiva de 10x e 20x (Leica). Foram examinadas 8 lâminas de cada animal, sendo analisados 8 campos de cada lâmina. As imagens gravadas permitiram a determinação da área (µm<sup>2</sup>) e densidade dos adipócitos com o auxílio do programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

#### 5.14 Medidas ósseas

O fêmur esquerdo e a coluna vertebral foram limpos de tecidos moles e armazenados em tubos *Falcon* contendo solução salina NaCl 0,9%.

No fêmur foram medidas as distância entre as epífise e a largura ponto médio da diáfise. Na coluna vertebral foi determinado seu comprimento. Essas mensurações ósseas foram realizadas com auxílio de paquímetro digital com precisão de leitura de 0,01 milímetros (COSTA, 2011).

#### 5.15 Avaliações de dano celular causado por estresse oxidativo em tecido adiposo retroperitoneal

##### 5.15.1 Atividade das enzimas antioxidantes

A medida da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) foi realizada no tecido adiposo retroperitoneal preparado com tampão fosfato.

##### Medida da Superóxido Dismutase

A enzima SOD catalisa a dismutação do  $\bullet\text{O}_2^-$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A determinação da atividade da enzima se baseou na medida da concentração de adenocromo, resultante da oxidação da noradrenalina pelo  $\bullet\text{O}_2^-$ . Este ensaio foi realizado utilizando a técnica descrita por Bannister & Calabrese (1987), adaptada para o tecido adiposo. Amostras de 20, 40 e 60 ml do tecido adiposo foram incubadas com 970ml tampão glicina (3,75 mg/mL de água destilada) e noradrenalina (19 mg/mL de água destilada), em cubetas separadas. Foram adicionados 20 ml da enzima catalase (1,2 mg/ml de água destilada) ao meio, para retirar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado pela reação catalisada pela SOD. A concentração de adenocromo foi medida em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 Pro-Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em 480 nm, um intervalo de 180 segundos.

##### Medida da catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formando oxigênio molecular e  $\text{H}_2\text{O}$ . A atividade da enzima foi avaliada através do

consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela reação. Foram utilizados 200 ml de homogenato do tecido adiposo retroperitoneal em cubetas de quartzo, incubadas com 2 mL de tampão fosfato (PBS) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.16%). A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliada durante 60 segundos por espectrofotômetro, no comprimento de onda 240 nm (Ultrospec 2100 Pro-Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), em um intervalo de 60 segundos (AEBI, 1984).

#### Medida da Glutathione Peroxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H<sub>2</sub>O e álcool, usando a glutathione (GSH) como doador de elétrons. Ela está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. Amostras 200 ml de homogenato do tecido adiposo retroperitoneal foram incubadas com 1800 ml de tampão fosfato (PBS), glutathione reduzida (2 mM), glutathione redutase (0.11 mg/mL) e azida sódica (0.065 mg/mL) durante 10 minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas leituras em um intervalo de 180 segundos. Posteriormente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por 240 segundos. O taxa de decaimento da NADPH foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda 340 nm (Ultrospec 2100 Pro-Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Esta adaptação foi realizada utilizando a técnica descrita por Flohé & Gunzler (1984).

#### 5.15.2 Ensaio pró-oxidantes

A utilização de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) permite avaliar o estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídios de membrana é determinado pela formação de subprodutos da peroxidação lipídica – malondialdeído (MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microssomos.

Amostras contendo 200 ml de homogenato do tecido adiposo retroperitoneal e 400 ml de ácido tricloroacético (TCA) foram centrifugadas por 10 min em 1000 rpm à 4°C. Foram separados 500ml do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionados 500ml de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100°C) por 30 minutos. MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo

Após esfriar por 5 minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro a 532 nm. Esta padronização foi adaptada da técnica descrita por Draper & Hadley (1990).

A Carbonilação de Proteínas é um método utilizado para dosagem de oxidação de proteínas e se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de proteínas como aminoácidos (histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4- dinitrofenilhidrazina.

Foram utilizados 100ml do tecido adiposo retroperitoneal, em duplicata. Que foram lavados com solução de HCL-Acetona, TCA 10%, TCA 20%, TCA 30%, e etanol-Acetato de Etila. Em cada lavagem as amostras foram centrifugadas por 3 min a 600g, e descartado o sobrenadante. Uma parte das amostras foi incubada com 2,4-dinitrophenylhydrazine e outra parte incubada com HCL 2M por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Todas as amostras foram incubadas com guanidina 6M a 60°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas e o conteúdo de carbonil determinado em espectrofotômetro a 370 nm usando um coeficiente 22.0000 Molar-1em nmol/mg de proteínas, como descrito por LEVINE et al. (1990).

Dosagem de Proteínas: As proteínas totais das amostras estudadas foram quantificadas através do método de Bradford em placa de ELISA (Jamef®), utilizando a albumina bovina (SIGMA®) (Bradford, 1976).

### 5.16 Análise estatística

Os resultados de ingestão alimentar, massa e comprimento corporal foram analisados através do método de análise de variância (ANOVA) bivariada, seguida do pós-teste de Bonferroni. Todos os resultados foram previamente analisados com o teste de normalidade Kolmogorov-Sminov para verificar se as amostras apresentavam ou não uma distribuição paramétrica. Apresentando uma distribuição paramétrica, os grupos experimentais serão analisados entre eles, mas não apresentando a distribuição paramétrica, os grupos não poderão ser analisados juntos, somente grupos com a mesma idade. Assim todas as análises foram realizadas o método de ANOVA univariada, seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni. Todos os resultados foram expressos como média±erro padrão



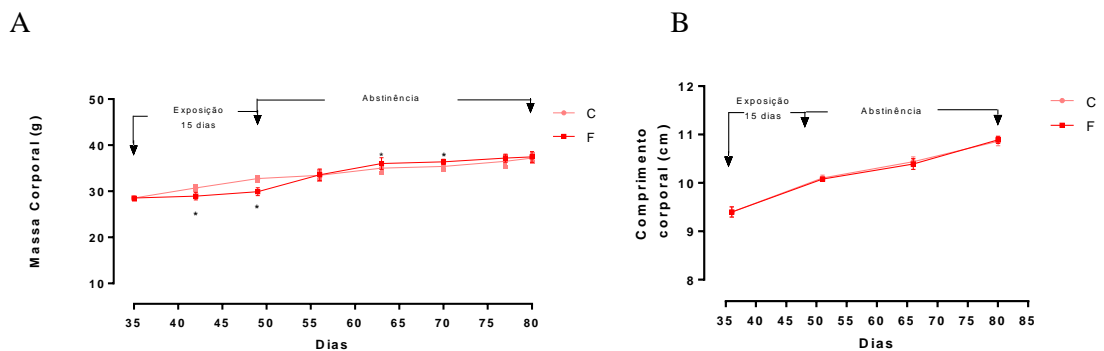
da média (EPM), considerando o nível de significância de  $p < 0.05$ . O software utilizado foi o *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com), EUA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1. Evolução da massa corporal (A) e do comprimento corporal (B) em fêmeas e machos

Aos 35 dias de idade, a massa e comprimento corporais das fêmeas era  $28,52 \pm 0,44$  g e  $9,40 \pm 0,83$  cm, respectivamente. Durante a exposição à fumaça houve a manutenção da massa no grupo F e ganho no grupo C. Durante a abstinência, o grupo F apresentou ganho de massa significativo até os 70 dias e, ao final do período a massa corporal foi semelhante entre os grupos (C:  $35,39 \pm 0,85$ ; F:  $36,39 \pm 0,56$ ). Não houve diferença no comprimento corporal entre os grupos ao longo período experimental. Esses resultados são apresentados nos Gráficos 1A e 1B.

Gráfico 1 - Evolução da massa corporal (A) e do comprimento corporal (B) em fêmeas

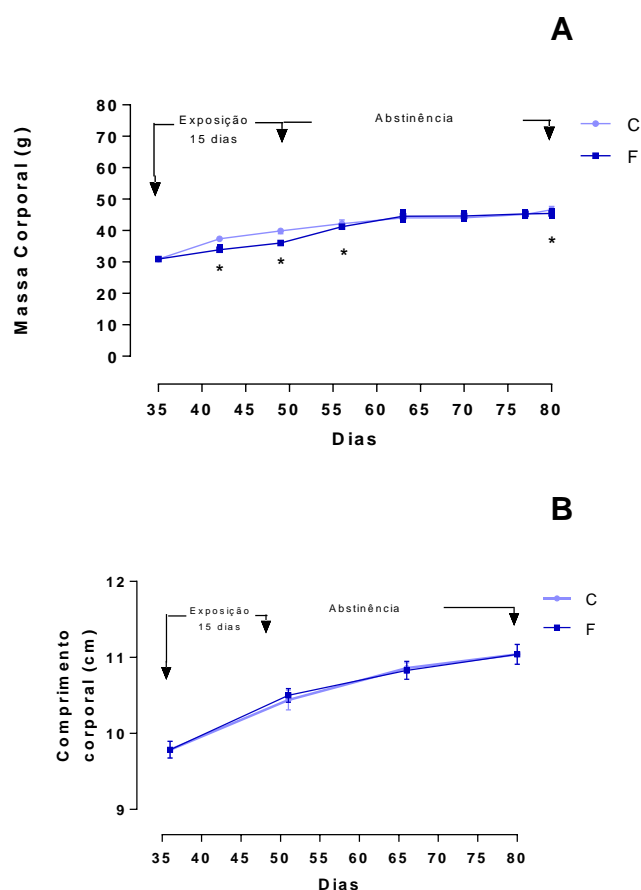


Legenda: Fêmeas (A). C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n=8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ . ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016

Aos 35 dias de idade, a massa e comprimento corporais dos machos foi  $30,92 \pm 0,50$  g e  $9,78 \pm 0,11$  cm, respectivamente. Durante a exposição à fumaça, a massa corporal no grupo F foi menor que o grupo C. No período de abstinência, o grupo F apresentou ganho de massa corporal, se tornando semelhante ao grupo C até os 78 dias de idade. Ao final, 80 dias de idade a massa do grupo F foi menor que no grupo C (C:  $46,64 \pm 1,05$ ; F:  $45,41 \pm 1,08$ ). O comprimento corporal foi semelhante entre os grupos, ao longo do experimento, sem diferença significativa. Esses resultados são apresentados nos Gráficos 2A e 2B.

Gráfico 2 - Evolução da massa corporal (A) e do comprimento corporal (B) dos machos



Legenda: Machos. C (controle sem contato com a fumaça, n=8 ) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n= 8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média ± EPM, \* p<0,05; \*\*\* p<0,0001. ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

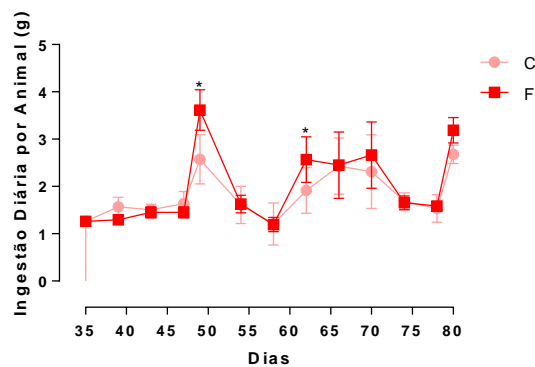
Fonte: A Autora, 2016

## 6.2 Evolução da ingestão alimentar de fêmeas e machos

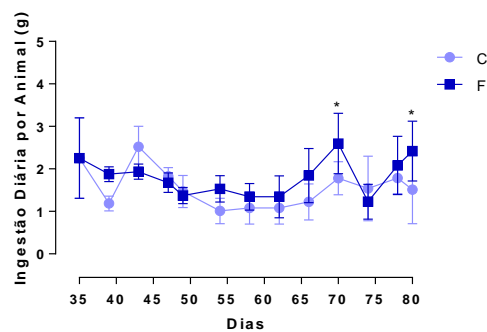
A ingestão alimentar, por animal aos 35 dias de idade, foi  $1,25 \pm 0,10$  nas fêmeas e  $1,18 \pm 0,17$  nos machos, sem diferença entre os gêneros durante a exposição. No período de abstinência, fêmeas e machos ex-fumantes apresentaram tendência a maior ingestão que os controles, sendo em alguns momentos a diferença significativa. Esses resultados são apresentados nos Gráficos 3 A e 3 B.

Gráfico 3- Evolução da ingestão alimentar de fêmeas e machos

**A**



**B**



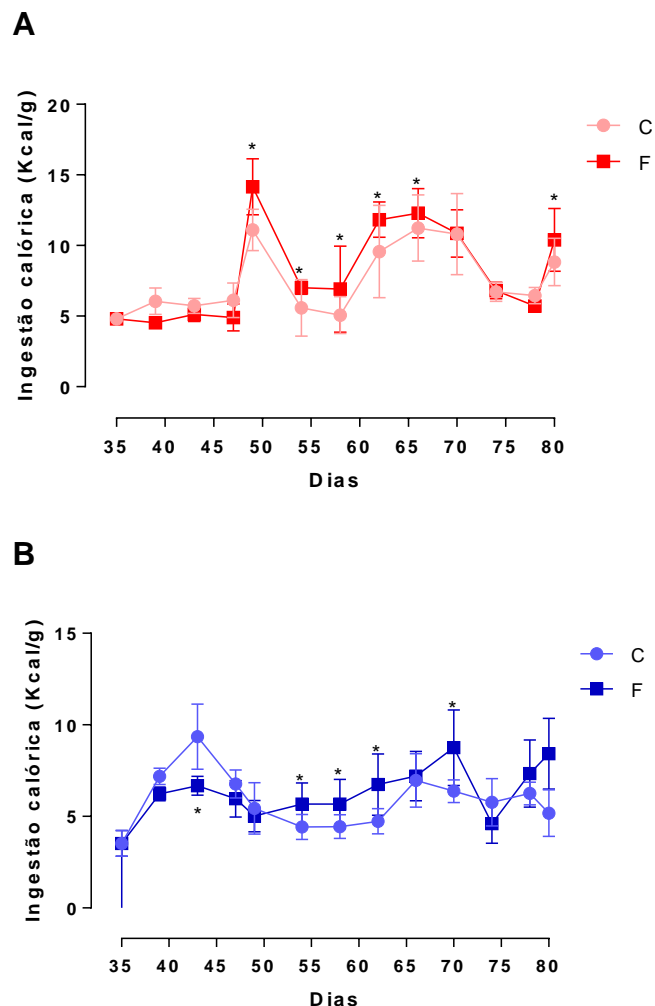
Legenda: Fêmeas (A) e machos (B). C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n=8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ . ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016

### 6.3 Ingestão calórica de fêmeas e machos

A ingestão calórica aos 35 dias de idade nas fêmeas foi  $4,81 \pm 0,40$  Kcal/g e nos machos  $3,52 \pm 0,69$  Kcal/g. Durante a exposição, as fêmeas F apresentaram tendência a menor ingestão calórica, enquanto nos machos essa tendência apresentou períodos de diminuição significativa. No período de abstinência, a ingestão calórica de fêmeas e machos ex-fumantes se apresentou significativamente maior que nos controles na maior parte do período. Esses resultados são apresentados nos gráficos 4A e 4B.

Gráfico 4 – Ingestão calórica de fêmeas e machos



Legenda: Fêmeas (A) e machos (B). C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n=8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ . ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016

#### 6.4 Avaliação da composição corporal por DXA de fêmeas e machos

A análise da composição corporal por DXA demonstrou maiores valores para gordura corporal total e massa de gordura do tronco nas fêmeas F/15. Após período de abstinência, os valores tenderam a serem maiores, mas sem diferença significativa em relação ao C/30. A massa magra total não diferiu durante a exposição a fumaça e foi significativamente maior no grupo A, após período de abstinência.

Os machos apresentaram valores semelhantes após a exposição à fumaça (C e F/15) e após período de abstinência (C/30 e A).

Esses resultados são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1- Avaliação corporal por DXA**

<b>Fêmeas</b>	<b>C</b>	<b>F/15</b>	<b>C/30</b>	<b>A</b>
Gordura corporal total (g)	11.86±0.07	15.17±0.87*	11.83±0.74	14.38±0.96
Gordura corporal tronco (g)	9.17±1,16	13.00±0.68*	10.20±0.58	11.60±0.97
Massa magra (g)	11.43±0.89	10.0±0.89	13.60±1.89	17.25±1.49*
<b>Machos</b>	<b>C</b>	<b>F/15</b>	<b>C/30</b>	<b>A</b>
Gordura corporal total (g)	13.00 ± 0.81	13.17 ± 1.04	16.67 ± 1.05	16.00 ± 0.89
Gordura corporal tronco (g)	3.75 ± 0.85	3.75 ± 0.25	6.200 ± 0.66	6.167 ± 0.54
Massa magra (g)	21.00 ± 1.52	18.00 ± 1.30	24.40 ± 0.87	22.86 ± 0.93

Legenda: Análise por DXA em camundongos fêmeas e machos, após 15 dias de exposição à fumaça C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n= 8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média ± EPM. \*  $p < 0,05$ , ANOVA univariada (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016.

## 6.5 Massa dos tecidos de fêmeas e machos

Após período de exposição à fumaça, o grupo fêmea F/15 apresentou maior massa de tecido adiposo retroperitoneal e menor massa de tecido adiposo mesentérico e o grupo machos F/15 apresentou maior massa de tecido adiposo epididimal. Ambos os grupos apresentaram menores massas de fígado em relação ao grupo C e nenhuma diferença em relação aos demais tecidos.

Após 30 dias de abstinência, as fêmeas do grupo A apresentam menores massas de tecidos adiposos mesentérico e subcutâneo, sem diferenças nos demais tecidos entre C/30 e A. Nos machos as diferenças nas massas tecido adiposo epididimal e fígado permaneceram e ainda o grupo A apresentou maiores massas de tecido adiposo retroperitoneal, mesentérico e subcutâneo em relação ao C/30.

Os resultados são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2 – Massa dos Tecidos de Fêmeas e Machos**

Tecidos	C	F/15	C/30	A
Adiposo Retroperitoneal	0.360±0.03	0.570 ±0.07*	2.250±0,60	1.510 ±0,28
Adiposo Mesentérico	1.070±0.08	0.917 ±0.24*	0.725±0,13	0.304±0,04*
Adiposo Subcutâneo	0.210±0.02	0.280 ±0.02	0.860±0,17	0.290 ±0,06*
Pulmão	0.200±0.01	0.170 ±0.01	0.220±0,01	0.190 ±0,01
Fígado	1.340±0.05	1.150±0.05*	1.450±0,19	1.400 ±0,10

Tecidos	C	F/15	C/30	A
Adiposo Retroperitoneal	0.416 ±0.02	0.503 ±0.07	0.27 ±0,07	0.69 ±0,10*
Adiposo Mesentérico	0.390 ±0.05	0.340 ±0.05	0.44 ±0,09	0.89 ±0,10**
Adiposo Epididimal	0.911±0,07	1.260±0,08*	0.59±0,09	1.15±0,10**
Adiposo Subcutâneo	0.290 ±0.07	0.290 ±0.06	0.44 ±0,10	0.92 ±0,13*
Pulmão	0.200 ±0.01	0.180 ±0.009	0.22±0,012	0.20 ±0,005
Fígado	1.870 ±0.04	1.530 ±0.10*	1.84 ± 0,04	1.53 ±0,10

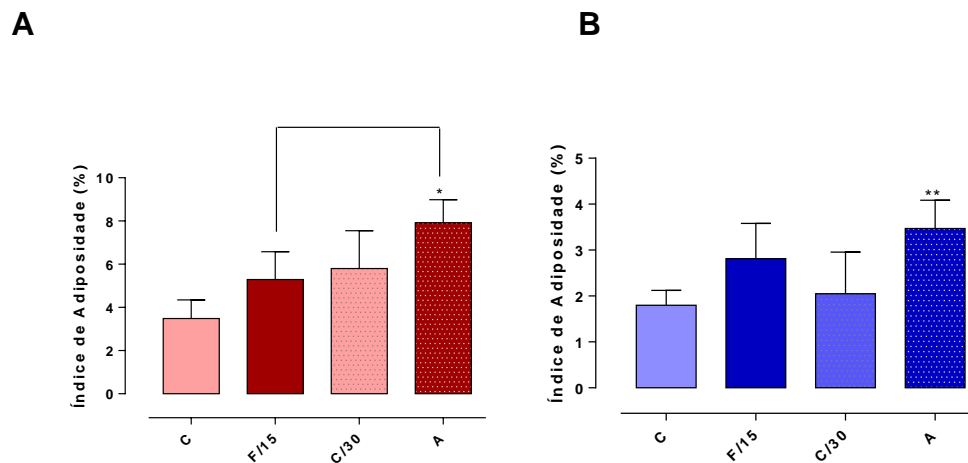
Legenda: Massa de tecidos em camundongos fêmeas e machos após 15 dias de exposição à fumaça C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n= 8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média ± EPM. \* p<0,05, \*\* p<0,001 ANOVA univariada (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016.

## 6.6 Índice de adiposidade em fêmeas e machos

O índice de adiposidade foi significativamente maior nas fêmeas após a exposição à fumaça e após período de abstinência (C:  $3,482 \pm 0,35$ ; F/15:  $5,292 \pm 0,52$ ; C/30:  $5,798 \pm 0,71$ ; A:  $7,910 \pm 0,43$ ). Nos machos, a resposta foi semelhante mas, só houve diferença estatisticamente significativa entre C/30 e A (C:  $1,798 \pm 0,13$ ; F/15:  $2,812 \pm 0,313$ ; C/30:  $2,047 \pm 0,34$ ; A:  $3,469 \pm 0,23$ ). Esses resultados são apresentados nos Gráficos 5.

Gráfico 5 – Índice de Adiposidade em fêmeas (A) e machos (B).



Legenda: Fêmeas (A) e machos (B). C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n=8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,02$ . ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016.



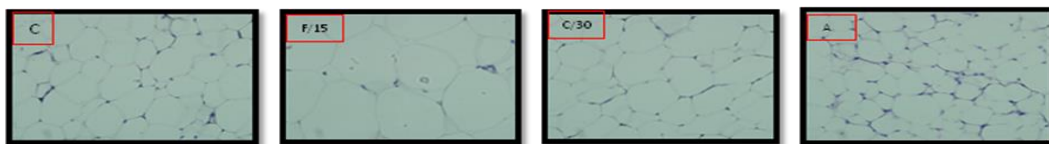
## 6.7 Morfologia e morfometria do tecido adiposo retroperitoneal das fêmeas e dos machos

A morfometria do TA retroperitoneal mostrou que as fêmeas após exposição à fumaça apresentam maior área e menor número de adipócitos. E, após período de abstinência, a área dos adipócitos é menor e o número de adipócitos é maior no grupo A, em relação ao C/30 Gráfico 6 A.

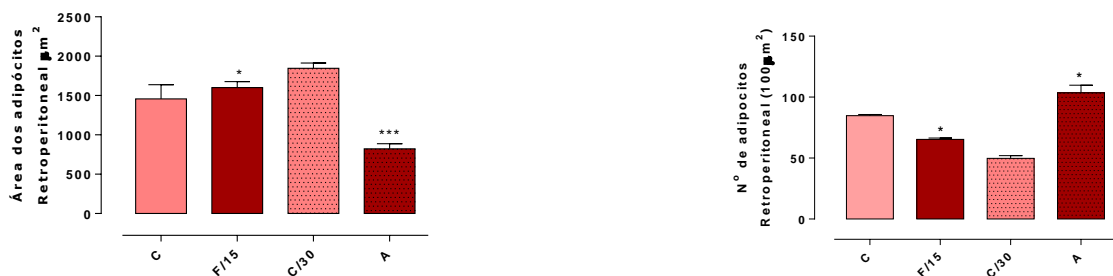
Nos machos, a área dos adipócitos foi menor nos grupos F/15 e A, após exposição e após abstinência, enquanto o número de adipócitos tendeu a ser maior nesses grupos, mas a só foi estatisticamente superior entre C/30 e A. Gráfico 6B.

Gráfico 6 – Morfologia e morfometria do tecido adiposo retroperitoneal das fêmeas (a) e (B) e machos (C) e (D).

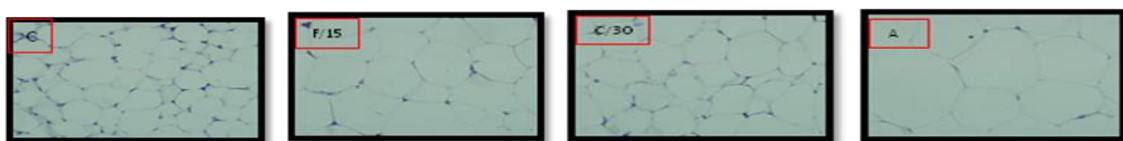
A



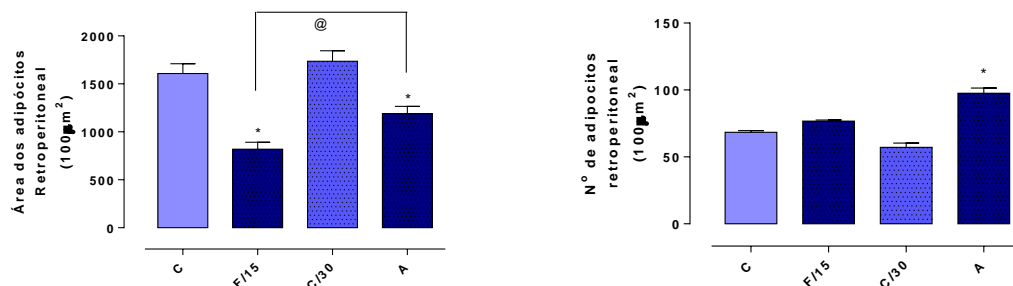
B



C



D



Legenda: Fêmeas (A) e machos (B). C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n=8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média ± EPM, @ p<0,05. ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

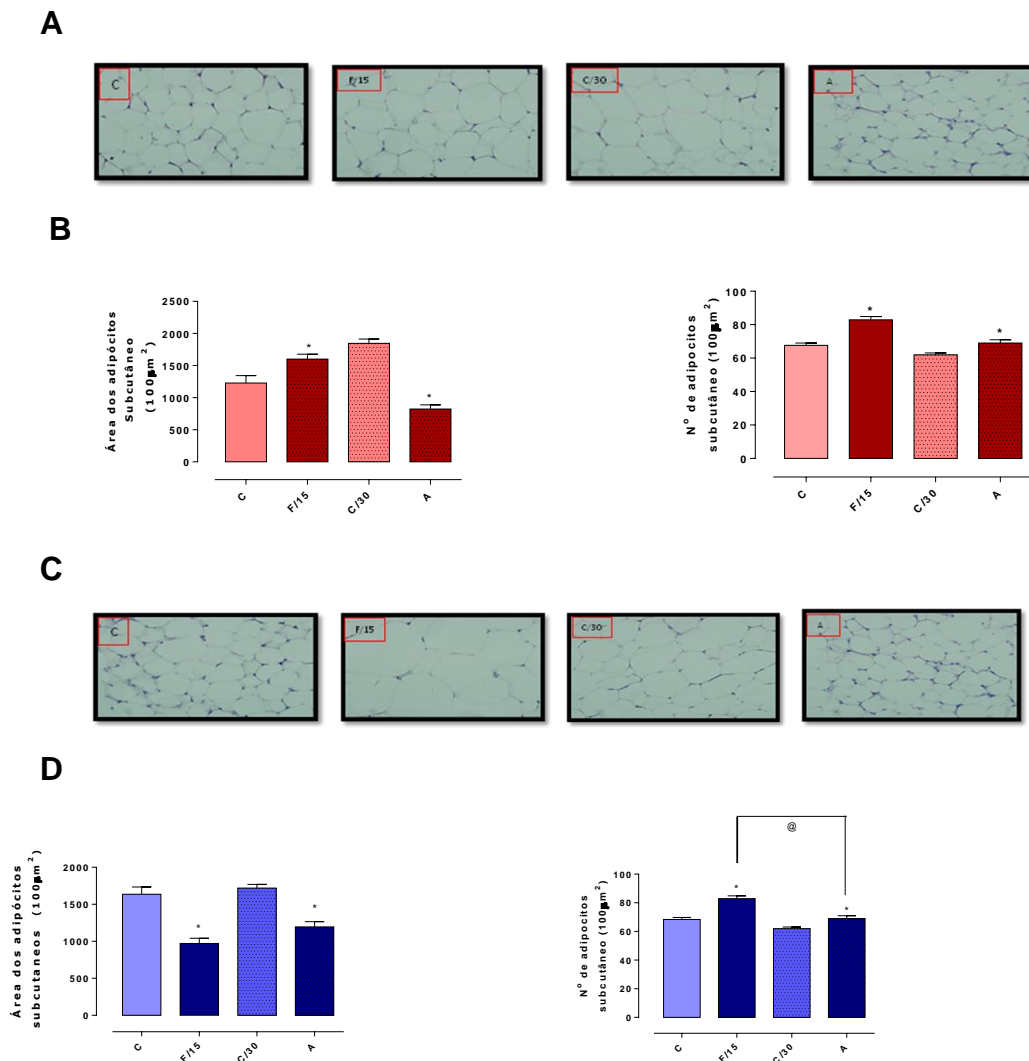
Fonte: A Autora, 2016.

## 6.8 Morfometria e morfologia do tecido adiposo subcutâneo das fêmeas e dos machos

A morfometria do TA subcutâneo mostrou que as fêmeas F/15, após exposição à fumaça, apresentam maior número de adipócitos e maiores áreas que o grupo C. Após período de abstinência, a área dos adipócitos é menor e o número de adipócitos é significativamente menor no grupo A, em relação ao grupo C/30.

Nos machos, após a exposição à fumaça e após abstinência, os grupos F/15 e A apresentaram valores significativamente menores que C e C/30 para a área e maiores para o número de adipócitos. Esses resultados são apresentados nos gráficos 7A, 7B, 7C e 7D.

Gráfico 7– Morfologia e morfometria do tecido adiposo retroperitoneal dos machos (a) e (B) e machos (C) e (D).



Legenda: Fêmeas (A) e machos (B). C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n=8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média ± EPM, @ p<0,05. ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016.

## 6.9 Medidas ósseas: fêmur e coluna vertebral

As medidas realizadas nos ossos, altura da coluna vertebral e distância entre as epífises e ponto médio da diáfise, em fêmures, durante o período de exposição à fumaça de cigarro permaneceram semelhantes entre os grupos C e F/15 e, após período de abstinência entre os grupos C/30 e A, em fêmeas e machos.

Os resultados são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3: Medidas ósseas**

<b>Fêmeas</b>	<b>C</b>	<b>F/15</b>	<b>C/30</b>	<b>A</b>
<b>Coluna Vertebral (mm)</b>				
<b>Altura</b>	16.26±0,06	16.50±0,10	16.56±0,41	17.43±0,14
<b>Fêmur (mm)</b>				
<b>Distância entre as epífises</b>	14.83±0,20	15.21±0,16	15.56±0,41	16.43±0,14
<b>Ponto médio da diáfise</b>	1.61±0.02	1.78±0,06	1.62±0,06	1.77±0,04
<b>Machos</b>	<b>C</b>	<b>F/15</b>	<b>C/30</b>	<b>A</b>
<b>Coluna Vertebral (mm)</b>				
<b>Altura</b>	18.94 ± 0.20	18.90 ± 0.25	18.24± 0.59	18.36 ± 0.18
<b>Fêmur (mm)</b>				
<b>Distância entre as epífises</b>	17.46 ± 0.19	16.50 ± 0.13	18.01 ± 0.19	16.41± 1.07
<b>Ponto médio da diáfise</b>	1.75 ± 0.04	1.87 ± 0.04	1.78 ± 1.91	1.91 ± 0.02

Legenda: Medidas de fêmures e coluna vertebral em camundongos fêmeas e machos após 15 dias de exposição à fumaça C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n=8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média ± EPM. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Bonferroni, C vs F/15, C/30 vs. A.. Anova Univariada

Fonte A Autora , 2016.

## 6.10 Indicadores glicêmicos em fêmeas e machos

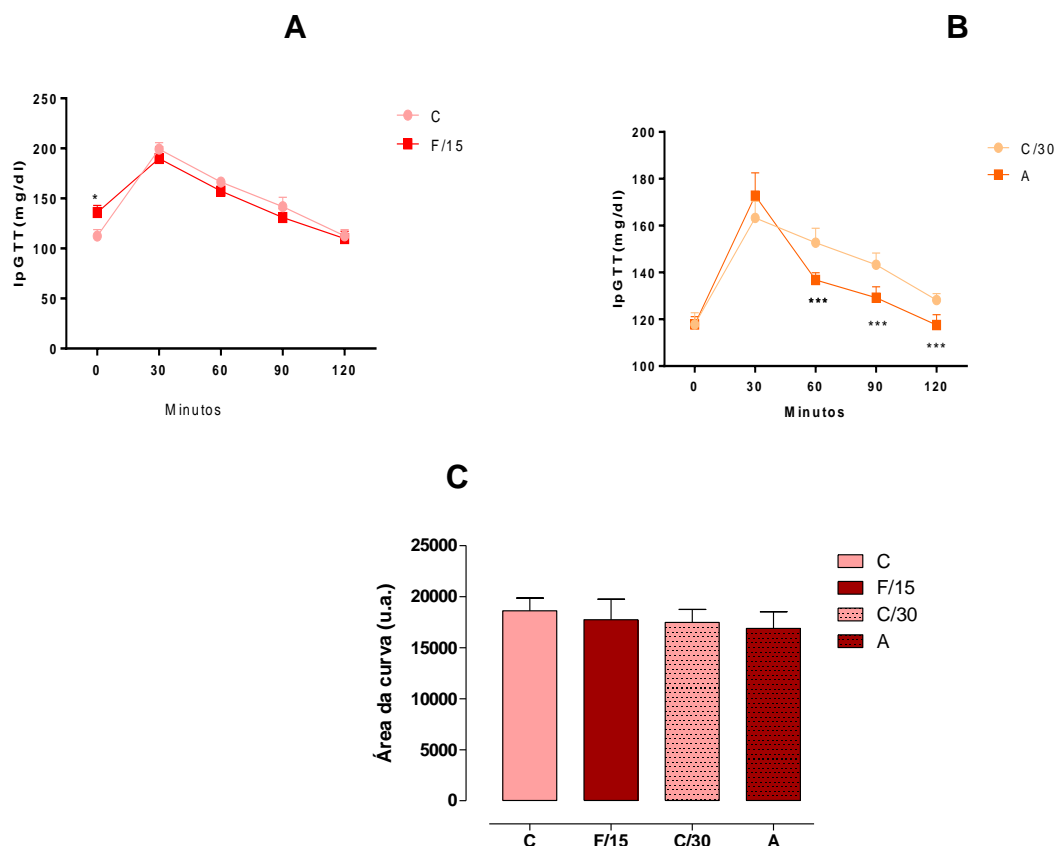
### 6.10.1 Teste de tolerância à glicose em camundongos fêmeas e machos

Ao final do período de exposição à fumaça, a glicemia de jejum do grupo F/15 foi superior a do grupo C (ponto 0: C= 112,4±6,43; F/15= 136,0±7,02) e nos demais pontos (30, 60, 90, 120) a glicemia foi semelhante entre C e F/15 Gráfico 8A.

Ao final do período de abstinência, 79 dias, a glicemia de jejum e após 30min foi semelhante entre C/30 e A, mas foi menor para o grupo A, nos pontos 60 (C/30: 152,7±6,13; A: 136,8±310), 90 (C/30: 143,3±5,01; A: 129,2±4,65) e 120 (C/30: 128,2±2,76; A: 117,5±4,44), Gráfico 8B.

A avaliação da área média da curva, não mostrou diferença entre os grupos experimentais (Gráficos 8C). Os resultados são apresentados no Gráfico 8 (A, B e C).

Gráfico 8– Teste de tolerância à glicose em camundongos das fêmeas (a) e (B) e Área da curva (C).



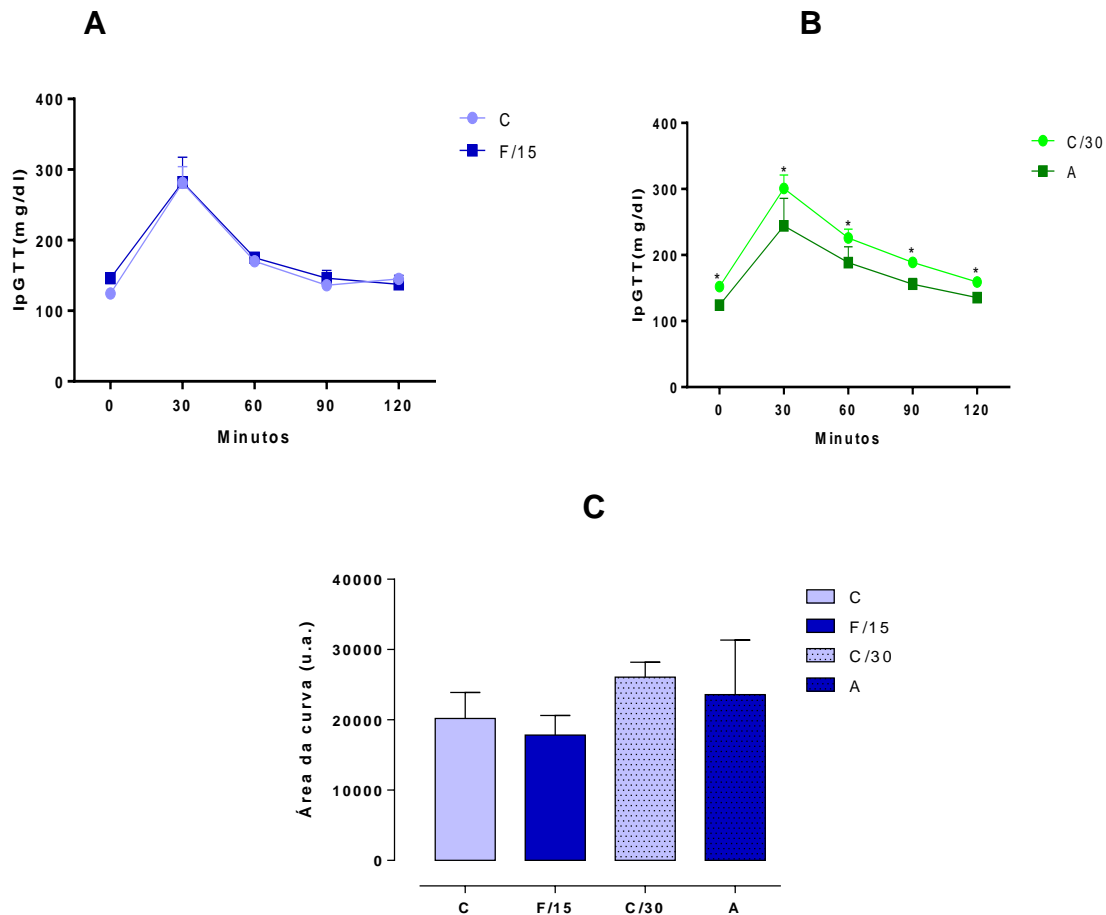
Legenda: Fêmeas. C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n=8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média ± EPM, \* p<0,05; \*\*\* p<0,0001. ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016

Após o período de exposição à fumaça de cigarros os grupos C e F/15 machos apresentaram valores glicêmicos semelhantes em todos os pontos da curva, Gráfico 10 A. Ao final do período de abstinência, o grupo A apresentou menores valores de glicemia em todos os pontos da curva glicêmica: pontos 0 (C:152,0±3,64; F/15: 124,3±5,45), 30 (C:300,8±20,40; F/15:244,3±41,64), 60 (C/30:225,7±13,53; A: 188,4±24,08), 90 (C/30:188,8±7,48; A:155,8±8,65) e 120 (C/30:159,3±4,14; A: 135,5±6,89), Gráfico 9B.

A avaliação da área média da curva, não mostrou diferença entre os grupos experimentais. Esses resultados podem ser observados nos gráficos 9 (A, B e C).

Gráfico 9 – Teste de tolerância à glicose em camundongos dos machos (a) e (B) e Área da curva (C).



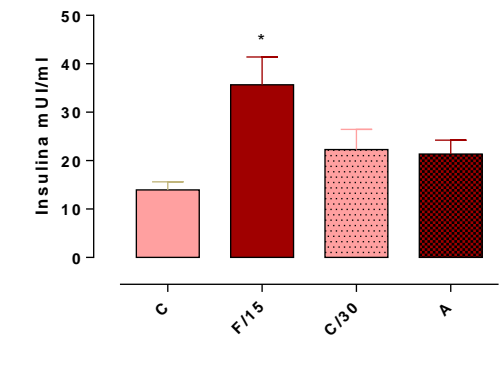
Legenda: Machos. C (controle sem contato com a fumaça, n=8 ) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n= 8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média ± EPM, \* p<0,05 ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016.

### 6.10.2 Concentração plasmática de Insulina de fêmea e machos

Após o período de exposição à fumaça de cigarros, a insulina circulante apresentou concentração significativamente maior no grupo F/15. Após período de abstinência, os grupos experimentais permaneceram semelhantes (C:  $13,98 \pm 1,65$ ; F/15:  $35,65 \pm 5,75$ ; C/30:  $22,28 \pm 4,14$ ; A:  $21,38 \pm 2,86$ ). Os resultados são apresentados no Gráfico 10.

Gráfico 10 – Teste de tolerância à glicose em camundongos das fêmeas.

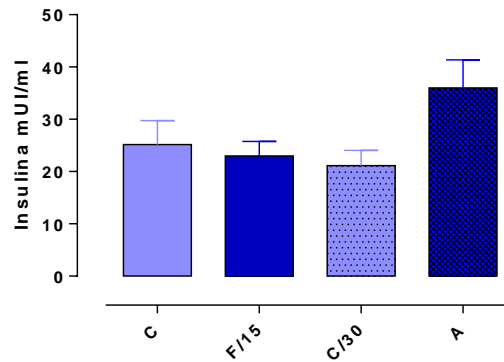


Legenda: Fêmeas. C (controle sem contato com a fumaça, n=8 ) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n= 8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$  ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016.

A concentração de insulina foi semelhante entre os grupos durante todo o período experimental (C:  $25,17 \pm 4,58$ ; F/15:  $22,97 \pm 2,78$ ; C/30:  $21,13 \pm 2,92$ ; A:  $35,98 \pm 5,39$ ). Os resultados são apresentados no Gráfico 11.

Gráfico 11 – Teste de tolerância à glicose em camundongos dos machos



Legenda: Machos. C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n=8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$  ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016.

### 6.10.3 Índices de HOMA

O índice de resistência a insulina, HOMA-IR, não se alterou nos períodos avaliados. No entanto, mostrou uma tendência a aumento, imediatamente após a exposição a fumaça de cigarros. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Índices de HOMA

<b>Fêmeas</b>	<b>C</b>	<b>F/15</b>	<b>C/30</b>	<b>A</b>
HOMA-IR	5.59±1,31	8.86±1,42	8.95±1,57	7.90±1,02
HOMA β	38.89±4.27	86.31±11.97	51.68±8.05	72.82±12.4
		*		4

Legenda: Índices de HOMA em camundongos fêmeas após 15 dias de exposição à fumaça C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n= 8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média ± EPM ANOVA univariada, seguida do pós-teste Bonferroni, C vs F/15, C/30 vs A.

Fonte: A Autora, 2016.



O índice de resistência à insulina, HOMA-IR, não se alterou após a exposição à fumaça. No entanto, após o período de abstinência, houve um aumento significativo no A.

Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Índices de HOMA

<b>Machos</b>	<b>C</b>	<b>F/15</b>	<b>C/30</b>	<b>A</b>
<b>HOMA-IR</b>	10.05±1.54	7.88±0.90	7.06±0.69	13.51±2.24*
<b>HOMA <math>\beta</math></b>	60.29±9.58	56.30±7.94	64.71±6.32	75.78±8.33

Legenda: Índices de HOMA em camundongos machos após 15 dias de exposição à fumaça C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n= 8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ , ANOVA univariada, seguida do pós-teste Bonferroni.

Fonte: A Autora, 2016.

### 6.11 Avaliações plasmáticas em fêmeas e machos

Após a exposição à fumaça de cigarro nas fêmeas, as concentrações de colesterol, triglicerídeos permaneceram semelhantes entre C e F/15, enquanto as de leptina foram maiores no grupo F/15. Após período de abstinência a concentração de colesterol foi significativamente maior e triglicerídeo menor no grupo A e, a leptina ficou semelhante entre C/30 e A.

Nos machos, após a exposição à fumaça de cigarro, a concentração de colesterol, se apresentou maior no grupo F/15, enquanto as concentrações de triglicerídeos e leptina foram semelhantes entre C e F/15. Após período de abstinência a concentração de colesterol ficou semelhante entre C/30 e A. No entanto, triglicerídeo ficou significativamente menor e leptina maior no grupo A, em relação a C/30.

A detecção de cotinina no plasma dos animais dos grupos F15 (fêmeas e machos) indica a exposição à fumaça, diferente do observado nos grupos C, C/30 e A. Esses resultados são apresentados nas Tabelas 6.

Tabela 6: Avaliações plasmáticas em fêmeas e machos

<b>Fêmeas</b>	<b>C</b>	<b>F/15</b>	<b>C/30</b>	<b>A</b>
<b>Colesterol (mmol/dl)</b>	<b>3.79±0.48</b>	<b>4.92±0.96</b>	<b>1.23±0.19</b>	<b>1.86±0.18*</b>
<b>Triglicerídeo (mmol/dl)</b>	<b>1.57±0.29</b>	<b>1.34±0.13</b>	<b>2.18±0.40</b>	<b>1.12±0.12**</b>
<b>Leptina (ng/ml)</b>	<b>2.51±0.10</b>	<b>3.60±0.49*</b>	<b>3.67±0.59</b>	<b>3.82±0.71</b>
<b>Cotina (ng/ml)</b>	-	<b>63,25±6,61</b>	-	-

<b>Machos</b>	<b>C</b>	<b>F/15</b>	<b>C/30</b>	<b>A</b>
<b>Colesterol (mmol/dl)</b>	<b>6.12±0.39</b>	<b>7.17±0.25*</b>	<b>2.05±0.11</b>	<b>2.51±0.50</b>
<b>Triglicerídeo (mmol/dl)</b>	<b>1.24±0.16</b>	<b>1.28±0.06</b>	<b>2.27±0.28</b>	<b>1.25±0.16*</b>
<b>Leptina (ng/ml)</b>	<b>4.67±0.61</b>	<b>2.86±0.23</b>	<b>3.41±0.69</b>	<b>6.05±0.86*</b>
<b>Cotina (ng/ml)</b>	-	<b>17,99±1,69</b>	-	-

Legenda: Análises plasmáticas de camundongos fêmeas e machos após 15 dias de exposição à fumaça C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n= 8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média ± EPM. \* p<0,05, ANOVA univariada, seguida do pós-teste Bonferroni, C vs F/15, C/30 vs A.

Fonte: A Autora, 2016.

Não foram observadas alterações nos conteúdos hepáticos de colesterol e triglicerídeos entre os grupos, nos dois períodos estudados.

Esses resultados são apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Conteúdo hepático de colesterol e triglicerídeo

<b>Fêmeas</b>	<b>C</b>	<b>F/15</b>	<b>C/30</b>	<b>A</b>
Colesterol Hepático (mg/dl)	1.49±0.04	1.68±0.13	1.53±0.06	1.37±0.07
Triglicerídeo Hepático (mg/dl)	2.56±0.23	2.05±0.17	2.13±0.14	1,86±0.20
<b>Machos</b>	<b>C</b>	<b>F/15</b>	<b>C/30</b>	<b>A</b>
Colesterol Hepático (mg/dl)	1.39±0,09	1.41±0,09	1.48±0,12	1.39±0,09
Triglicerídeo Hepático (mg/dl)	2.31±0,16	1.91±0,13	2.14±0,08	1.95±0,07

Legenda: Análise hepática de colesterol e triglicerídeos em camundongos fêmeas e machos após 15 dias de exposição à fumaça C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n= 8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média ± EPM. ANOVA univariada, seguida do pós-teste Bonferroni.

Fonte: A Autora, 2016.

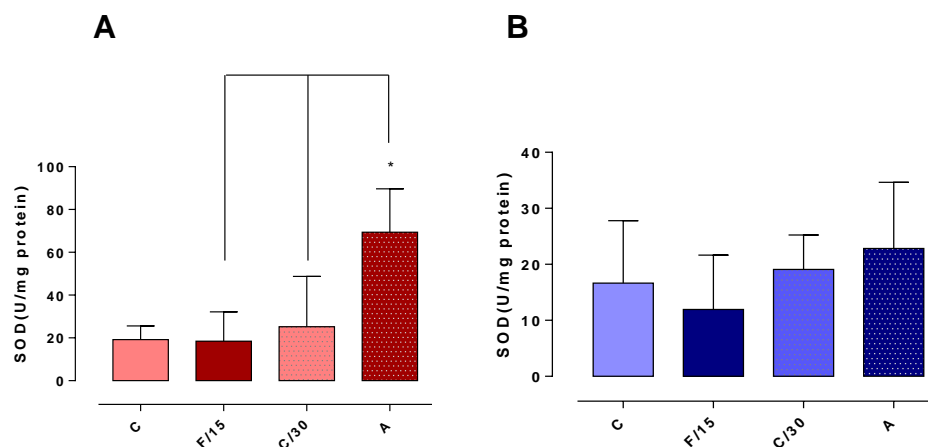
## 6.12 Indicadores da integridade/dano do tecido adiposo retroperitoneal provocado por estresse oxidativo

### 6.12.1 Quantificação das enzimas anti-oxidantes

A exposição à fumaça de cigarro não alterou a atividade da SOD no tecido adiposo retroperitoneal, em fêmeas ou em machos, F(C:  $19,18 \pm 2,85$ ; F/15:  $18,45 \pm 5,20$ ; C/30:  $25,28 \pm 8,87$ ; A:  $69,39 \pm 7,67$ ); M(C:  $16,65 \pm 4,54$ ; F/15:  $11,95 \pm 4,33$ ; C/30:  $19,10 \pm 3,07$ ; A:  $22,84 \pm 5,27$ ).

Após 30 dias de abstinência, as fêmeas apresentaram atividade da SOD significativamente maior no grupo A, tanto em relação ao grupo C/30, quanto em relação ao grupo F/15A. Em machos a atividade permaneceu semelhante ao do grupo C/30. Esses resultados são apresentados nos Gráficos 12 A e 12 B.

Gráfico 12- Atividade superóxido dismutase (SOD) fêmeas (A) e machos (B)



Legenda: Fêmeas (A) e machos (B). C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n= 8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média ± EPM, \*  $p < 0,05$  ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

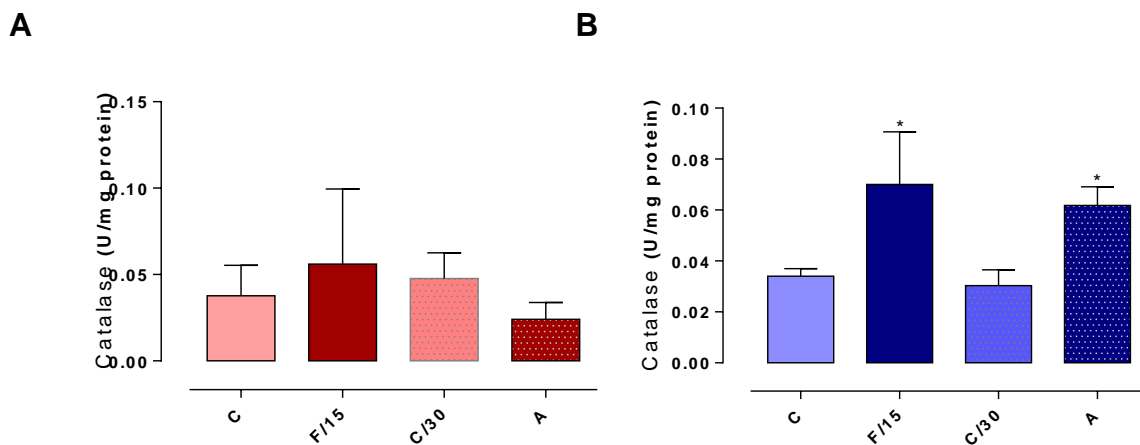
Fonte: A Autora, 2016.

### 6.12.2 Atividade da catalase

A exposição à fumaça de cigarro e o período de abstinência não provocaram alteração da atividade da catalase nas fêmeas (C:  $0,037 \pm 0,007$ ; F/15:  $0,056 \pm 0,019$ ; C/30:  $0,047 \pm 0,006$ ; A:  $0,024 \pm 0,004$ ).

Nos machos, a exposição à fumaça de cigarro provocou um aumento significativo da atividade da catalase (C:  $0,034 \pm 0,001$ ; F/15:  $0,070 \pm 0,008$ ) que se manteve significativamente aumentada, em relação a C/30, após 30 dias de abstinência (C/30:  $0,030 \pm 0,002$ ; A:  $0,061 \pm 0,002$ ). Esses resultados são apresentados nos Gráficos 13A e 13B.

Gráfico 13- Atividade da catalase fêmeas (A) e machos (B).



Legenda: Fêmeas (A) e machos (B). C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n=8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$  ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

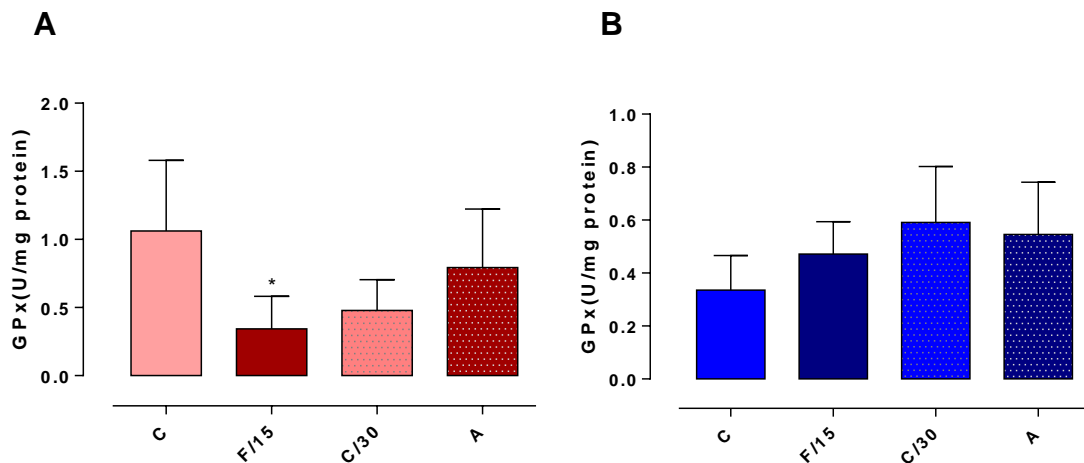
Fonte: A Autora, 2016.

### 6.12.3 Atividade glutaciona peroxidases (GPx)

A exposição à fumaça de cigarro provocou menor atividade da glutaciona peroxidase nas fêmeas do grupo F/15, em relação ao grupo C (C:  $1,061 \pm 0,23$ ; F/15:  $0,343 \pm 0,10$ ). Após 30 dias de abstinência, a atividade da GPx não diferiu entre os grupos C/30 e A.

Nos machos, a atividade GPx permaneceu semelhante entre os grupos C e F/15 após a exposição a fumaça e também entre C/30 e A, após 30 dias de abstinência (C:  $0,335 \pm 0,05$ ; F/15:  $0,472 \pm 0,04$ ; C/30:  $0,591 \pm 0,07$ ; A:  $0,545 \pm 0,07$ ). Esses resultados são apresentados nos Gráficos 12A e 12B.

Gráfico14- Atividade glutaciona peroxidases (GPx) fêmeas (A) e machos (B).



Legenda: Fêmeas (A) e machos (B). C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n=8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média ± EPM, \*  $p < 0,05$  ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016.

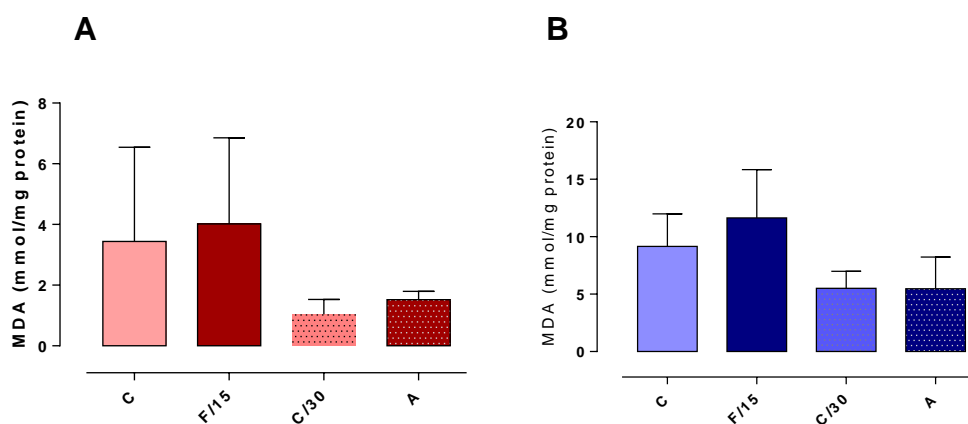
## 6.12.4 Quantificação de metabólitos determinantes da peroxidação

### 6.12.4.1 Determinação da peroxidação lipídica, pelo método de TBARS

Em fêmeas, a produção de malondialdeído (MDA) a partir de reação com TBAR, foi semelhante entre C e F/15 após a exposição à fumaça e, também, após abstinência entre C/30 e A, sendo as concentrações no período de exposição superiores as observadas após período de abstinência (C:  $3,438 \pm 1,03$ ; F/15:  $4,017 \pm 0,94$ ; C/30:  $1,039 \pm 0,21$ ; A:  $1,521 \pm 0,08$ ).

Nos machos, a produção de MDA não se alterou entre C e F/15, nem entre C/30 e A (C:  $9,152 \pm 1,26$ ; F/15:  $11,640 \pm 1,71$ ; C/30:  $5,506 \pm 0,52$ ; A:  $5,470 \pm 1,04$ ), mas, a produção após exposição à fumaça foi maior que no período após a abstinência. Esses resultados são apresentados nos gráficos 15A e 15B.

Gráfico 15- Determinação por TBARS fêmeas (A) e machos (B).



Legenda: Fêmeas (A) e machos (B). C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n=8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$  ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016.

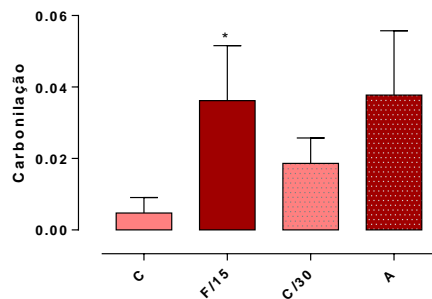
#### 6.12.4.2 Determinação da carbonilação de proteínas

A oxidação de proteínas, pelo método de carbonilação de proteínas, foi significativamente maior após a exposição à fumaça e, após período de abstinência apresentou tendência a ser maior no grupo A (C:  $0,004 \pm 0,002$ ; F/15:  $0,036 \pm 0,006$ ; C/30:  $0,018 \pm 0,004$ ; A:  $0,037 \pm 0,009$ ).

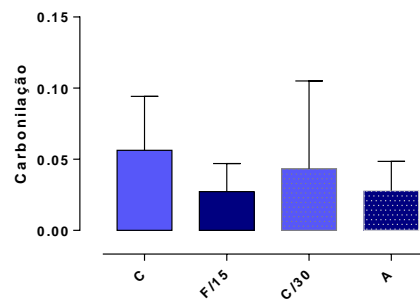
Nos machos, a carbonilação proteica se mostrou semelhante entre os grupos após a exposição a fumaça e após a abstinência, com a tendência a menores concentrações nos grupos F/15 e A (C:  $0,05 \pm 0,019$ ; F/15:  $0,027 \pm 0,007$ ; C/30:  $0,043 \pm 0,027$ ; A:  $0,028 \pm 0,008$ ). Esses resultados são apresentados nos gráficos 16A e 16B.

Gráfico 16 - Determinação da carbonilação proteica em camundongos fêmeas (A) e machos (B).

**A**



**B**



Legenda: Fêmeas (A) e machos (B). C (controle sem contato com a fumaça, n=8) e F/15 (exposto à fumaça por 15 dias, n=8) e, após 30 dias de abstinência C/30 (controle, n=8) e A (ex-fumante após 30 dias de abstinência, n=8). Valores são expressos em média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$  ANOVA univariada, (pós-teste Bonferroni).

Fonte: A Autora, 2016.



## 7 DISCUSSÃO

No Brasil, desde o final da década de 1980, sob a ótica da promoção da saúde, a gestão e governança do controle ao tabagismo vêm sendo articuladas pelo Ministério da Saúde através do INCA, com ações educativas, de comunicação, de atenção à saúde, associados à adoção ou cumprimento de medidas legislativas e econômicas, para prevenir a iniciação ao tabagismo. Apesar da queda no percentual geral de fumantes, uma atenção especial deve ser dada aos jovens e adolescentes menores de 18 anos, cujos índices de adesão ao tabagismo passaram de 2,4% em 2008 para 3,7% em 2013 (INCA, 2015).

No presente estudo, alguns aspectos do comportamento alimentar e da composição corporal de camundongos fêmeas e machos, foram abordados visando compreender os efeitos provocados pelo cigarro em organismos jovens.

Os cigarros comerciais apresentam grande variabilidade na composição e na concentração de seus componentes (SMITH, 2006). Na pesquisa básica são utilizados cigarros cuja constituição é padronizada, apresentando como uma possível variável o teor de nicotina. Neste estudo foi utilizado o cigarro 3R4F, que contém 0,73mg nicotina no *puff*, sendo por isso considerado de moderado a alto teor (ABREU-VILLAÇA et al, 2010).

A intensa exposição à fumaça, por 8h consecutivas ao longo de 15 dias, em câmara hermeticamente fechada, levou à inalação dos componentes do cigarro, que foi confirmada pela alta concentração de cotinina no sangue dos animais F/15, fêmeas e machos e, estão de acordo com dados da literatura (ABREU-VILLAÇA et al, 2010; SMITH et al 2015). Ficou evidente que camundongos e humanos não apresentam similaridade quanto ao teor de cotinina circulante, já que as concentrações encontradas diferem do padrão de referência de adolescentes fumantes do sexo masculino de média 11,4 ng/ml (CARABALLO, GIOVINO & PECHACEK, 2004) para camundongos machos 17ng/ml. Surpreendentemente, camundongos fêmeas apresentaram concentrações 3 vezes maiores que a dos machos.

A idade de início (35 dias de vida) e tempo de exposição à fumaça de cigarro (15 dias) foram determinados por Abreu-Villaça et al (2010), considerando o período de transição entre a fase pré-pubere e a completa maturidade sexual para roedores (dos 28 aos 42 dias), quando são evidenciadas mudanças no córtex pré-frontal, no sistema límbico, a abertura vaginal em fêmeas e a presença de espermatozóides em

machos (SPEAR, 2000). Assim, para as fêmeas, o período experimental teve início concomitante ao início da ciclicidade estral e, portanto, com o acompanhamento de eventos da puberdade definidos pela ação do estradiol: a abertura vaginal e a ocorrência do primeiro estro, avaliado por citologia vaginal (Paquete, 2007).

Durante a exposição à fumaça, a massa corporal dos animais fumantes fêmeas e machos (F/15) foi menor que a de seus respectivos controles, com baixo ou nenhum ganho de massa durante os 15 dias. Nesse período, a ingestão alimentar diária e a ingestão calórica foram semelhantes entre os grupos C e F/15. No entanto, a ingestão calórica em alguns momentos tendeu a menores valores. Esse comportamento alimentar foi semelhante nos dois gêneros, sem qualquer alteração na evolução do comprimento corporal e no crescimento de fêmures e coluna vertebral. Provavelmente, o fato dos animais serem jovens e se encontrarem em fase de desenvolvimento devem ter um metabolismo adaptado que mantém seu ritmo de crescimento. Este resultado está de acordo com os dados de Chen et al (2005) que também verificaram a manutenção da massa corporal em camundongos jovens expostos por 10 dias e sem alteração da ingestão alimentar. Por outro lado, difere de dados em humanos adultos de ambos os sexos, que apresentaram perda de massa corporal (CHATKIN et al 2007; CHIOLERO, 2008), sugerindo o efeito anorético do cigarro.

Durante os 30 dias de abstinência, a tendência ao aumento de ingestão alimentar determinou maior ingestão calórica no grupo ex-fumante, que foi traduzida pelo aumento da massa corporal nas fêmeas, mas não nos machos. O ganho de massa corporal é uma resposta típica e bastante descrita em adultos que param de fumar (PEREKINS, KENNETH, 1993) sendo o aumento médio de 5,2Kg em mulheres, no primeiro ano de abstinência (CHATKIN, 2007), podendo chegar a 13 Kg após 10 anos de abstinência em homens e mulheres (CHIOLERO, 2008). Em mulheres e homens adultos, o aumento da fome e da ingestão calórica está direcionado, preferencialmente, para carboidratos ou gordura (PERKINS, KENNETH, 1993). Assim, o aumento da ingestão é acompanhado pelo aumento da massa corporal (MORGAN, 1987; GRUNBERG, 1984; OSEI-HYIAMAN, 2005; KIRKHAM, 2005). Em mulheres adultas fumantes por cerca de 20 anos, após quatro semanas de abstinência, o aumento o ganho de massa corporal foi associado a maior atividade da LPL no tecido adiposo (FERRARA, 2001).

A maioria dos estudos experimentais não relaciona a massa corporal à ingestão alimentar. Acreditamos que, durante o período de exposição os componentes do cigarro, provavelmente a nicotina, tenham modulado o centro do

apetite além de programar alterações celulares que modificaram a resposta dos tecidos metabólicos frente ao mesmo consumo alimentar. Embora o controle central do apetite não tenha sido alvo de estudo, para melhor entender essa diferença são necessários estudos que correlacionem o tabagismo a regulação do apetite pelo sistema nervoso central de roedores jovens. Já que a regulação da homeostase envolve regiões do cérebro como hipotálamo, córtex, tronco cerebral e amígdala, embora o hipotálamo integre vários sinais humorais e nervosos relacionados à regulação do apetite (WILLIAMS, 2000).

A exposição à fumaça para as fêmeas foi um fator indutor do ganho de gordura do tronco e total, refletida pelo ganho de massa de tecido adiposo retroperitoneal. Na análise morfométrica – que pode ser considerada um parâmetro indireto de avaliação da função tecidual - a hiperplasia dos adipócitos do tecido retroperitoneal sugere ser o determinante do seu aumento de massa. Esses dados são confirmados pelo maior índice de adiposidade e concentração plasmática de leptina, verificados nas fêmeas fumantes. Surpreendentemente, no tecido subcutâneo, apesar da massa estar inalterada, em relação ao controle, a morfometria sugere a hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos. Os machos não apresentaram resposta expressiva sobre a gordura corporal, já que a única diferença em relação aos controles está no ganho de massa em tecido adiposo epididimal. Chen (2007) verificou perda de 47% da massa de tecido adiposo retroperitoneal em camundongos adultos após exposição crônica à fumaça por 7 semanas. A morfometria do tecido retroperitoneal sugere a manutenção do número de adipócitos e evidencia a diminuição de sua área, como fatores mantenedores da massa do tecido, que são confirmados pela não alteração do índice de adiposidade e da leptina circulante. Enquanto no tecido subcutâneo, o sugestivo quadro de hiperplasia foi acompanhado por inalteração da massa do tecido. Até onde foi verificado na literatura, os estudos que relacionam o tecido adiposo com o fumo em animais também avaliaram tecido adiposo marrom, em diferentes períodos de exposição e utilizando outros tipos de cigarro (CHEN 2006, CHEN 2007, CHEN 2008), o que dificulta a avaliação comparativa dos dados.

Após período de abstinência, a gordura corporal foi semelhante entre controles e ex-fumantes, fêmeas e machos. Mas, com distintas respostas entre os gêneros. Nas fêmeas, o índice de adiposidade não se relaciona às massas dos tecidos intraabdominais, inalterados ou diminuídos nas ex-fumantes, mas sim, com a hipertrofia do tecido retroperitoneal. Enquanto, a concentração de leptina se correlaciona às massas de gordura semelhante entre controle e ex-fumante. No

tecido subcutâneo, a menor massa de tecido foi acompanhada pela hipertrofia dos adipócitos. Os machos, o índice de adiposidade e a leptina aumentados nos ex-fumantes se correlacionam a maiores massas de tecidos intraabdominais e hiperplasia dos adipócitos retroperitoneais. Com o mesmo padrão para o tecido subcutâneo. Cabe ressaltar, que os estudos que avaliam os efeitos do tabagismo sobre a composição corporal, em geral utilizam como indicadores, apenas a circunferência abdominal e o índice de massa corpórea (LISSNER, 1991; FERRARA, 2001; CHATKIN, 2007; CHIOLERO, 2008).

Como um tecido da alta atividade metabólica, o fígado foi afetado em fêmeas e machos durante a exposição à fumaça, tendo sua massa diminuída. Chen et al (2007) também encontraram esta diminuição após 7 semanas de exposição. Os 30 dias de abstinência foram suficientes para normalizar a massa hepática em ambos os sexos. Apesar de ter influenciado o peso, a exposição à fumaça não acarretou alteração ao conteúdo hepático de triglicerídeos e colesterol nem das concentrações plasmáticas de colesterol e triglicerídeos nas fêmeas. No entanto, nos machos o colesterol plasmático foi maior no grupo F/15. Estudo em jovens tabagistas, de ambos os sexos, não encontrou alteração desses lipídeos circulantes, mas os resultados demonstravam uma tendência a aumento (CAMARGO et al, 2006). Em camundongos machos expostos por 12 semanas, foi verificada menor concentração de TG sem alteração de colesterol (ZONG et al, 2015). Outros estudos demonstraram que a infusão de nicotina estimula a lipólise aumentando os níveis de triglicerídeos no jejum, tanto em humanos quanto em animais (SZTALRYD, 1996; ANDERSSON, 1997). Tais diferenças podem ser atribuídas a diferentes formas de atuação do fumo sobre aspectos bioquímicos e hematológicos promovendo variação intra e inter-individual (CAMARGO et al, 2006) . Após período de abstinência, fêmeas e machos não apresentaram alteração no conteúdo hepático de triglicerídeo e colesterol. No entanto, as fêmeas apresentaram aumento do colesterol e diminuição de triglicerídeo circulantes, enquanto, os machos tiveram menores concentrações de triglicerídeos, sem alteração do colesterol.

Na avaliação de índice glicêmico, fêmeas expostas à fumaça apresentaram concentrações plasmáticas aumentadas de glicose e insulina, sem alteração do padrão da curva glicêmica, da resistência a insulina, no entanto, com menor atividade das células beta pancreáticas, indicando possível alteração da ação da insulina. No entanto, após 30 dias de abstinência houve a normalização dos índices alterados, determinando o bom funcionamento das células beta pancreáticas e consequente ação da insulina periféricamente, mantendo a glicemia. Os resultados

são compatíveis com descrição da literatura para alteração em adultos humanos, que associada a menor sensibilidade à insulina à ação de agentes como a nicotina e o monóxido de carbono e que a abstinência ao fumo melhora esse quadro (ELIASSOM, 1997; HENKIN, 1999). Os machos, entretanto, apesar de não terem sido afetados expressivamente durante a exposição à fumaça, apresentaram menor glicemia de jejum e maior índice de resistência á insulina, sugerindo que o fumo compromete de forma silenciosa os índices glicêmicos.

Dentre as várias possibilidades de ação dos componentes do fumo sobre o organismo, existe ainda a ação sobre as células aumentando a produção de produtos tóxicos que alteram biomoléculas da estrutura celular, danificando a célula, comprometendo seu funcionamento e induzindo a morte precoce. Assim, após exposição a fumaça, o tecido adiposo retroperitoneal também foi avaliado em relação ao estresse oxidativo, não demonstrando alteração na atividade da superóxido dismutase, que representa a primeira linha do sistema de defesa intrínseco, impedindo o acúmulo de radicais livres e estimulando a formação de peróxido de hidrogênio, em fêmeas e em machos.

A outra enzima anti-oxidante, a catalase, responsável pela quebra de peróxido de hidrogênio, em  $H_2O$  e  $O^-$ , não revelou alteração nas fêmeas mas, aumentou nos machos, sugerindo que nestes houve maior presença de peróxido de hidrogênio estimulando o aumento da atividade da catalase.

Quanto a glutathione peroxidase sua atividade se encontrava diminuída nas fêmeas e aumentada nos machos, nestes sugerindo maior formação de álcois estáveis para estabilizar produtos da peroxidação lipídica. A detecção de peroxidação lipídica foi realizada através da ação de TBARs, na qual a produção de malondialdeído não se alterou entre os gêneros, porém com tendência aumento nos machos.

A avaliação da oxidação de proteínas foi determinada por carbonilação que evidenciou aumento nas fêmeas, sem alteração nos machos. O somatório dessas reações sugerem que a exposição a fumaça de cigarro compromete a função celular, elevando o risco de dano a estrutura proteica em fêmeas e prejudicando a estrutura lipídica celular. Como ambas são moléculas constituintes das membranas e organelas celulares, o dano se perpetua pela célula podendo ocasionar lesão precoce. É provável que o período de exposição, 15 dias, seja um tempo de prejuízo a função celular e, portanto, a manutenção do hábito de fumar, para esses camundongos jovens, poderia determinar respostas mais graves, com o prejuízo a

função celular bem estabelecido e também o aparecimento de comorbidades como o diabetes mellitus, em curto prazo.

Após a abstinência, causou surpresa o aumento a atividade da SOD nas fêmeas e da catalase nos machos. Os demais indicadores de estresse oxidativo se normalizaram, apesar dos valores estabelecidos apresentarem uma tendência ao aumento. Sugerindo que apesar do afastamento do fator agressor, a fumaça de cigarro, houve manutenção da produção de espécies reativas de oxigênio no tecido retroperitoneal, como uma reação contínua e de longo prazo e, talvez, irreversível.

## CONCLUSÃO

A exposição de organismos jovens à fumaça de cigarro, embora mantenha a massa corporal, modifica a distribuição e estrutura do tecido adiposo, com uma falsa impressão de boa estética. Colaborando para alterações metabólicas crônicas capazes de desencadear, em médio e longo prazo, a síndrome metabólica e o diabetes mellitus. A cessação do hábito de fumar, não reverte os danos provocados pela fumaça, cujo potencial tóxico permanece expressivo, afetando a composição corporal, a estrutura e função do tecido adiposo intraabdominal.

## REFERÊNCIAS

ABREU-VILLAÇA, Y, SEIDELER, FJ, E SLOTKIN, TA. Impact of adolescent nicotine exposure on adenylyl cyclase-mediated cell signaling : enzyme induction, neurotransmitter-specific effects, regional selectivities, and the role of withdrawal. *Brain Res.* 988, 164-72; 2003.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Washington, 1996.

ARAÚJO, D. M., LAPCHA, K., COLLIER, B. et al. Characterization of N (3H) methylcarbamylcholine binding sites and effect of N-methylcarbamylcholine on acetylcholine release in rat brain. *J Neurochem.*, 51:292, 1988.

AUDRAIN-MCGOVEM. J., RODRIGUEZ, D., TERCYAK, K. J., RODGERS, K., PATTERSON, F., Identifying and characterizing adolescent smoking trajectories, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13, 2023-34, 2004.

BAKER, R.R., ROBINSON, D.P. Tobacco combustion - the last ten years. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 16. pp. 3–71. 6, 1990.

BALFOUR, D. J., FAGERSTROM, K. O. Pharmacology of nicotine and its therapeutic use in smoking cessation and neurodegenerative disorders. *Pharmacol Therap.* 72:51. 1996.

BARBOSA, K. B. F., COSTA, N.M.B., ALFENAS, R.C.G., DE PAULA, S.O., MINIM, V.P.R., BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev. Nutr.*, 23(4):629-643, 2010.

BENOWITZ, N. L., ZEVIN, S, JACOB, P, III Supression of nicotine intake during ad libitum cigarette smoking by high-dose transdermal nicotine. *J. Pharmacol, Exp. Ther.*; 287: 958-962, 1998.

BORDIN, R.; NIPPER, V. B.; SILVA, J. O. & BORTOLOMIOL, L. Smoking Prevalence among Students from a Metropolitan Area in the Southern Region of BRAZIL, 1991. *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro, 9 (2): 185-189, Apr/Jun, 1993.

BORGERDING, M. AND KLUS, H. Analysis of complex mixtures – Cigarette smoke. *Experimental and Toxicological Pathology*; 57: 43-73, 2005.

BRASIL, Lei nº 10.702. Dispõe sobre as restrições ao uso e à propaganda de produtos fumigantes, bebidas alcoólicas, medicamentos, terapias e defensivos agrícolas, nas termos do § 4º do art. 220 da Constituição Federal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 jul. 2003.*

Brasil.Lei nº 8.069, de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 jul. 1990.*

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Vigilância de Tabagismo em Escolares: VIGESCOLA 2002-2009. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/vigescola> Acesso em: 11 de dez 2015.



BRESLAU, N., KILBEY, M. M., ANDRESKI, P. Nicotine dependence and major depression: new evidence from a prospective investigation. *Arch. Gen. Psychiatry*. 50, 11, 1993.

BRIDGES, A. B., COMBS, J. B., HUMBLE, J. W. et al. Population characteristic and cigarette yields as determination of smoke exposure. *Pharmacol Bioetiem Behavior.*; 37:17, 1990.

BROOKE, O G Effects of birth weight of smoking, alcohol caffeine, socioeconomic factors and psychosocial stress. *Brit Med J.*; 298:785, 1989.

BROOKS, J E *The Mighty Leaf, Tobacco through the countries*. Ed A. Redman Ltda. Lindres, 1953.

CAMARGO, T.M.; ROCHA-JUNIOR, D.S.; FERREIRA, S.R.; VASCONCELOS, E.M.A.; OLIVEIRA, S.J.; SHITARA, E.S.; OSHIMA-FRANCO, Y. Influência do tabagismo sobre as análises laboratoriais de rotina: um estudo piloto em adultos jovens. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 27, n.3, p.247-251, 2006.

CANOY D, WAREHAM N, LUBEN R, WELCH A, BINGHAM S, DAY N, KHAW KT. Cigarette smoking and fat distribution in 21,828 British men and women: a population-based study. *Obes Res* 13: 1466–1475, 2005.

CANCELLO, R.,TORDJMAN, J., POITOU, C., GUILHEM, G., BOUILLOT, J. L., HUGOL, D., et al. Increasedinfiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55, 1554–1561. doi:10.2337/db06-0133. 2006.

CARPENTER, M .J., MATTHEW J. , GARRETT-MAYER E., VITOC C. , CARTMELL K. , BIGGERS S., ALBERG A.J. Adolescent nondaily smokers: Favorable views of tobacco yet receptive to cessation, *Nicotine & Tobacco Research*; 11(4): 348–355, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Behavioral risk factor surveillance system: prevalence data, tobacco use - 2003. United States, 2003. Disponível em: . Acesso em: 01 set. 2004.

CHEN H., HANSEN, M J, JONES, J E., VLAHOS, R., ANDERSON, G P., MORRIS, M J. Detrimental metabolic effects of comvining long-term cigarette smoke exposure and high-fat diet in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293:1564-71, 2007.

CHEN, H., HANSEN, M J., JONES, J E, VLAHOS, R, BOZINOVSKI, S., ANDERSON, G. P., MORRIS, M J. Cigarette smoke exposure reprograms the hypothalamic neuropeptide Y axis to promote weight loss. *American Journal of Respiratory and critical care medicine.*; 173, 2006.

CHEN H., VLAHOS R., BOZINOVSK S., JONES J., GARY P. A., Morris M. J. Effect of Short-Term Cigarette Smoke Exposure on Body Weight, Appetite and Brain Neuropeptide Y in Mice. *Neuropsychopharmacology* 30, 713–719, advance online publication, 27 October 2004;. doi:10.1038/sj.npp.1300597. 2005.

CHEN, J; MILAR, W J. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Rep*. 9: 39-46, 1998.

CHIOLERO, A, FAEH, D, PACCAUD F, CORNUZ, J, Consequences of smoking for body weight, body fat distribution and insulin resistance, *Am J Clin Nutr.* 87:801-9, 2008.

CINTI S. Adipocyte differentiation and trans differentiation: plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest*; 10:823-35, 2002.

\_\_\_\_\_. The adipose organ. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.*; 73: 9-15, 2004.

\_\_\_\_\_. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc.* 60(3):319-28, 2001.

CONOR, J. J., MC DERMOTT, W. M., KLESGES, M. ET AL Cigarette smoking and body weight. *N Eng J Med.* 320:931, 1989.

CORNEILLET, *Dictionnaire des Arts et des Sciences.* Paris, 1964.

COSTA JV & DUATE JS. Tecido adiposo e adipocinas. *Acta Med Port*;19:251-256, 2006.

CRESPI, C.L., PENNAN, B. W., GELBOIN, H. V. ET AL. A tobacco smoke- derived nitrosamine 4- (methylnitrosemino)-1-(3-pyridil)-1- Butamina, is activated by multiple human cytochrome P450S including the polymorphism human cytochrome P450-2 D 6. *Carcinogenesis.*12:11971, 1991.

DIFRANZA, JR, RIGOTTI, NA, MCNEILL, AD, OCKENE, JK, SAVAGEAU, JA, ST.CYR, D, e Coleman, M. Initial Sympoms of nicotine dependence in adolescents. *Tobacco Control*; 9: 313-319; 2000.

DIFRANZA , J. , SAVAGEAU , J. , FLETCHER , K. , PBERT , L. , O'LOUGHLIN , J. , MCNEILL , A. , et al.. Susceptibility to nicotine dependence: The development and assessment of nicotine dependence in youth 2 study . *Pediatrics* , 120 , e974 – e983, 2007.

DOLL, R., CROFTON, J. Tobacco and health. *Brit M Bull.* 52:1. 1996.

EATOUGH, D.J., HANSEN, L.D., LEWIS, CCO E.A. The chemical characterization of environmental tobacco smoke. In: *Ecobiochon DJ, Wu JM, editors. Proceedings of the International Symposium at McGill University, 1989. Massachusetts: Lexington Books.* 199; 3-39, 1990.

ERIKSEN, M.; MACKAY, J.; ROSS, H. *The Tobacco Atlas.* Disponível em: <http://www.tobaccoatlas.org> Acesso em: 13/11/2014.

FERRARA, C. M., KUMAR M., NICKLAS B., MCCRONE S., GOLDBERG A. P., Weight gain and adipose tissue metabolism after smoking cessation in women. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25 (9):1322-6, 2001.

FLEGAL KM, CARROLL MD, OGDEN CL, CURTIN LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2008. *Journal of the American Medical Association.*;303:235–241. 2010.

FONSECA-ALANIS MH, TAKADA J, ALONSO-VALE MIC, LIMA FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab.* (50), 216-229, 2006.

FONTANA, L., EAGON, J. C., TRUJILLO, M. E., SCHERER, P. E., AND KLEIN, S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56, 1010–1013. doi:10.2337/db06-1656. 2007.

FULKERSON JA, FRENCH SA. Cigarette smoking for weight loss or control among adolescents: gender and racial/ethnic differences. *J Adolesc Health*; 32: 306–313, 2003.

FRAYN KN, FIELDING BA, KARPE F. Adipose tissue fatty acid metabolism and cardiovascular disease. *Lipidol.* 16:409-415, 2005.

FRUHBECK G, GOMEZ-AMBROSI J. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280: E827–E847, 2001.

FULKERSON JA, FRENCH SA. Cigarette smoking for weight loss or control among adolescents: gender and racial/ethnic differences. *J Adolesc Health*; 32: 306–313, 2003.

GILBERT, DGWR. *Emotion, anxiety and smoking.* 1989.

GIMENO RE, KLAMAN LD. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. *Curr Opin Pharmacol.*; 5(2):122-8, 2005.

GLICKMAN SG, MARN CS, SUPIANO MA ET AL . Validity and reliability of dual-energy x-ray absorptiometry for the assessment of abdominal adiposity. *J. Appl Physiol.*; 97: 509-514, 2004.

GLOBAL ADULT TOBACCO SURVEY. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). [cited 2014 May 29].

GRUNBERG NE, BOWEN DJ, WINDERS SE. Effects of nicotine on body weight and food consumption in female rats. *Psychopharmacology.*;90:101–105, 1986.

GUERIN, M .R., JENKINS, R.A., TOMKINS, B.A. *The chemistry of environmental tobacco smoke: composition and measurement.* Chelsea, Michigan: Lewis Publisher 1992.

HAJEK, P., JACKSON, P., BELCHER, M. Long term use of nicotine chewing gum. Occurrence determinants and effects on weight gain. *JAMA.* 260:1953, 1988.

HAMMOND, D., FONG, G.T., CUMMINGS, K.M., O'CONNOR, R.J., GIOVINO, G.A., MCNEILL, A. Cigarette Yields and human exposure: a comparison of alternative testing regimens. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention.* 15(8): 1495-501, 2006.

HARDY, O. T., CZECH, M. P., AND CORVERA, S. What causes the insulin resistance underlying obesity? *Curr. Opin. Endocrinol. DiabetesObes.* 19, 81–87. doi:10.1097/MED.0b013e3283514e13. 2012.

HAXBY, D.G. Treatment of nicotine dependence. *Am Health Sys Pharmaol.* 52:265,1995.

HECKERLING, G. ARTIGOS DE GREGÓRIO HECKERLING. [acesso em 17 abr. 2011] Disponível em: <<http://www.amigosdocachimbo.com.br/artigos/08mar2009>>.

HEIKKILÄ M. Development of the adrenogenital system: female sex determination, ovarian and adrenal gland ontogeny regulated by Wnt-4 in mice. Faculty of Science, University of Oulu. 2002.

HENNINGFIELD, J. E., KEENAN, R. M. Nicotine delivery kinetics and abuse liability. *J Consult Clin Psychol.* 61:743, 1993.

HERMSDORFF H.H.M., MONTEIRO J.B.R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? *Arq Bras Endocrinol Metab.* 6: 803-11, 2004.

HOUSTON, T. Tobacco: A Cultural History of How an Exotic Plant Seduced Civilization. Ed. *Medscape General Medicine.* 4(2): 403p, 2002.

HU Y, ZHANG Z, YANG C. The determination of hydrogen peroxide generated from cigarette smoke with an ultrasensitive and highly selective chemiluminescence method. *Anal Chim Acta;* 601(1):95-100. 2007.

INCA. Número de fumantes no Brasil. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2014/> . acesso em 26 de julho 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, Diretoria de Pesquisas. Pesquisa nacional por amostra de domicílios. Rio de Janeiro: IBGE; 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL). Coordenação Nacional de Controle do Tabagismo e Prevenção Primária de Câncer. Vigescola : vigilância do tabagismo em escolares. Rio de Janeiro,1, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Vigilância de tabagismo em escolas, dados e fatos de 12 capitais brasileiras, 1. Rio de Janeiro: Inca; 2004.

\_\_\_\_\_. Prevalência do tabagismo no Brasil: dados dos inquéritos epidemiológicos em capitais brasileiras. 2004.

JOVEM/ MULHER E TABACO. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. [acesso em 2013 junho 26]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/tabagismo/frameset.asp?item=jovem&link=namira.htm>.

JOVEM/MULHER E TABACO - [www.antidrogas.com.br/mostrasosvida.php](http://www.antidrogas.com.br/mostrasosvida.php)  
JARVIS, M. J., RAW, M., RUSSEL, M. A. H., FEYERABEND, C. Randomised controlled trial of nicotine chewing-gum. *Brit Med J.* 285:537, 1982.

JARRETT T., BLOSNICH J., TWOREK C., HORN K. Hookah use among U.S. college students: results from the National College Health Assessment II. *Nicotine & tobacco research.*;14(10):1145-53. 2012.

JENIFER, A, TRAUTH, JA., DEIDLER, FJ ET AL. Adolescent nicotine exposure produce immediate and longterm changes in CNS noradrenergic and dopaminergic function. *Brain Res.* 892: 269, 2001.

KANDEL , D., HU , M.-C., GRIESLER, P. , & SCHAFFFRAN, C. On the development of nicotine dependence in adolescence. *Drug and Alcohol Dependence.* 91:26-39, 2007.

KOH-BANERJEE P., CHU N.F., SPIEGELMAN D., ROSNER B., COLDITZ G., WILLETT W., et al. Prospective study of the association of changes in dietary intake, physical activity, alcohol consumption, and smoking with 9-y gain in waist circumference among 16 587 US men. *The American journal of clinical nutrition.*;78(4):719-27. 2003.

KOZLOWSKI, L., O'CONNOR, R.J., SWEENEY, C.T. Cigarette Design. In: *Risks associated with smoking cigarettes with low machine-measured yields of tar and nicotine. NCI smoking and tobacco control.* Bethesda (Maryland): U.S. Department of Health and Human Services, NIH, National Cancer Institute. 3, p.13-35, 2001.

KURSAWE,R.,CAPRIO,S.,GIANNINI,C., NARAYAN,D.,LIN,A.,D'ADAMO,E., et. al. Decreased transcription of ChREBP- $\alpha/\beta$  isoforms in abdominal subcutaneous adipose tissue of obese adolescents with prediabetes or early type 2 diabetes: associations with insulin resistance and hyperglycemia. *Diabetes* 62, 837–844. doi:10.2337/db12-0889. 2013.

LEY C.J., LEES B., STEVENSON J.C. Sex and menopause associated changes in body fat distribution. *Am J Clin Nutr.*55:950-4, 1992.

LYKKESLELDT J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta.*; 380(1-2):50-8. 2007.

LONCAR D. Development of thermogenic adipose tissue. *Int J Dev Biol.* 35: 321-333, 1991.

LUKASKI HC, HALL CB, MARCHELLO MJ ET AL. Validation of dual x-ray absorptiometry for body-composition assessment of rats exposed to dietary stressors *Nutrition.* 17: 607-613, 2001.

MAY A.M., ROMAGUERA D., TRAVIER N., EKELUND U., BERGMANN M.M., KAAKS R., et al. Combined impact of lifestyle factors on prospective change in body weight and waist circumference in participants of the EPIC-PANACEA study. *PloS one.*;7(11):e50712. 2012.

MARCONDES FK, BIANCH FJ, TANNO AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 62(4A): 609-14, 2002.  
MARIANI, M., FIGUEIRA, S. M., SEPÚLVERDA, C.P., ET AL. Intoxication por nicotina. *Pediatrica al Dia. Chile.*; 266: 67, 1988.

MATSUSHITA Y, NAKAGAWA T, YAMAMOTO S, TAKAHASHI Y, NODA M, MIZOUE T. Associations of smoking cessation with visceral fat area and prevalence of metabolic syndrome in men: the Hitachi Health Study. *Obesity*;19:647–651, 2010.

MCTERNAN PG, FISHER FM, VALSAMAKIS G, CHETTY R, HARTE A, MCTERNAN CL, ET AL. Resistin and Type 2 Diabetes: regulation of resistin

expression by insulin and rosiglitazone and the effects of recombinant resistin on lipid and glucose metabolism in human differentiated adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(12): 6098-106, 2003.

MELISKA, C J E GILBERT, D G. Hormonal and subjective effects of smoking the first five cigarettes of the day: a comparison in males and females. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 229:235, 1991.

MUSK, A.W., DE KLERK, N.H. History of tobacco and health. *Respirology.* 8(3): 286-90, 1987.

NATIONAL POISON DATA SYSTEM: Annual reports [Internet]. Alexandria (VA): American Association of Poison Control Centers;. Available from: <http://www.aapcc.org/annual-reports/> 2014.

NELSON JF, KARELUS K, FELICIO LS, JOHNSON TE. Genetic influences on the timing of puberty in mice. *Biol Reprod.* 42: 649-55, 1990.

O'LOUGHKIN, J.; PARADIS, G.; RENAUD, L.; GOMEZ, L.S. One-year predictors of smoking initiation and of continued smoking among elementary schoolchildren in multiethnic, low-income, inner-city neighborhoods. *Tobacco Control.* 7:268-75, 1998.

OUCHI, N., PARKER J L, LUGUS JJ, WALSH K, Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews – immunology.* 11:85, 2011.

PATTEN, CA, MARTIN, JE, E OWEN, N. Can psychiatric and chemical dependency treatment units be smoke free? *J Subst Abuse Treat.* 13:107-8, 1996.

PAQUETTE A., SHINODA M., RABASA R. L., PRUD'HOMME D., LAVOIE J.M. Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: impact of a high-fat diet. *Maturitas.* Oct 20;58(2):182-90. Epub 2007 Sep 21. 2007.

PARK EM, PARK YM, GWAK YS. Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. *Free Radic Biol Med.*; 25(1):79-86. 1998.

PERKINS, K.A., Kenneth A. Weight gain following smoking cessation. *Journal of consulting and clinical psychology.* 61(5), 768-77, 1993.

PIERCE, J.P., CHOI, W.S., GILPIN, E. A., FARKAS, A. J. Validation of susceptibility as a predictor of which adolescents take up smoking in the United States. *Health Psychol.* 15, 355-361, 1996.

PIGEYRE M., DUHAMEL A., POULAIN J.P., ROUSSEAU J., BARBE P., JEANNEAU S., et al. Influence of social factors on weight-related behaviors according to gender in the French adult population. *Appetite.*;58(2):703-9. 2012.

POMERLEAU CS, KURTH CL. Willingness of female smokers to tolerate postcessation weight gain. *Journal of Substance Abuse*;8:371–378, 1996.

REIDY & WEBER. Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 125 (3): 285-98, 2000.

REFERENCE CIGARETTE PROGRAM. 3R4F Preliminary analysis. College of Agriculture. University of Kentucky. [acesso em 2011 mai 29]. Disponível em: <http://www.ca.uky.edu/refcig/3R4F%20Preliminary%20Analysis.pdf>.

REIS J.P., LORIA C.M., SORLIE P.D., PARK Y., HOLLENBECK A., SCHATZKIN A. Lifestyle factors and risk for new-onset diabetes: a population-based cohort study. *Annals of internal medicine.*;155(5):292-9. 2011.

RIBEIRO FILHO FF, MARIOSIA LS. Gordura visceral e síndrome metabólica: Mais que uma simples associação. *Arq Bras Endocrinol Metab.*50, 2006.

ROSEMBERG, J. Nicotina. Colat : Colégio Médico del Peru, v.1, 1999.

\_\_\_\_\_. Pandemia do tabagismo enfoques históricos e atuais. São Paulo : Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2002.

\_\_\_\_\_. Nicotina: droga universal. Monografia. Produção Independente. São Paulo: 2004.

ROSEMBERG, J. MIRANDA M.A., ROSEMBERG A.M.A. Nicotina - Droga Universal. São Paulo (BR): Instituto Nacional de câncer (INCA); 2004. [citado em 10 setembro 2005]. Disponível on line: <http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/nicotina.pdf>.

SARGENT, J.D., DI FRANZA, J. R. Tobacco control for clinicians who treat adolescent. *CA cancer j clin.* 53:102, 2003.

SEATTLE, WA, USA; Department of Epidemiology and Biostatistics . MRC-HPA Centre for Environment and Health, Imperial College, London, UK. Available online 4 February 2011.

SELL H, DESHAIES Y, RICHARD D. The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int J Biochem Cell Biol.* 11:2098-104, 2004.

SHIMOHAMA, S., MULLR, D. C., ANDRES, R. Studies in the distribution of body fat. Effects of cigarette smoking. *JAMA.* 261:1169, 1989.

SLOTKIN, TA, COUSINS, MM, E SEIDLER, FJ. Administration of nicotine to adolescent rats evokes regionally selective upregulation of CNS alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *Brain Res.* 1030:159-163, 2004.

SMITH, C.J., PERFETTI, T.A., KING, J.A. Perspectives on Pulmonary smoke. *Experimental and Toxicological Pathology;* 57: 43-73, 2005.

SMITH D.,1 AHERRERA A., LOPEZ A., NEPTUNE E., WINICKOFF J. P., KLEIN J. D., CHEN G., LAZARUS P.,M.J., COLLACO S., MCGRATH-MORROW S. A. Adult Behavior in Male Mice Exposed to E-Cigarette Nicotine Vapors during Late Prenatal and Early Postnatal Life. *PLoS One.*; 10(9): 0137953. Published online 2015 Sep 15. doi: 10.1371/journal.pone.0137953. 2015.

SPEAR L.P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev.* Jun;24(4):417-63, 2000.

STEPPAN CM, BAILEY ST, BHAT S, BROWN EJ, BANERJEE RR, WRIGHT CM, ET AL. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 409:307-12, 2000.  
TAIOLI, E., WYNDER, E. L. Effect of the age at wich begins on frequency of smoking in adulthood. *N Eng J Med.* 325:968, 1991.

THE TOBACCO ATLAS. CIGARETTE CONSUMPTION. Disponível em: <http://www.tobaccoatlas.org/topic/cigarette-use-globally>. acesso em 18 maio 2015.

TIIG H & MOSCHEN AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature review-Immunol.*, 6, 2006.

US Department of Health and human Services, 1988

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – Executive summary: The regulations restricting the sale and distribution of cigarettes and smokeless tobacco to protect children and adolescent. Rockville. Md Food and Drug Administration. 1996.

VIGIÉ, M. E M. L' herb à Nicot. Ed Fayard, Paris, 1989.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General, 2014 Atlanta, USA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. 2014.

WAGER-SRDAR S.A., LEVINE A.S., MORLEY J.E., HOIDAL J.R., NIEWOEHNER D.E. Effects of cigarette smoke and nicotine on feeding and energy. *Physiology and Behavior.*;32:389–395, 1984.

WAKI H & TONTONOZ P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol.* 2:31-56, 2007.

WARJCHENBERG B. L. Tecido adiposo como glândula endócrina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1:13-20, 2000.

WEE CC, RIGOTTI NA, DAVIS RB, PHILLIPS RS. Relationship between smoking and weight control efforts among adults in the United States. *Arch Intern Med*; 161: 546–550, 2001.

WEEKLEY C.K., KLESGES R.C., REYLEA G. Smoking as a weight-control strategy and its relationship to smoking status. *Addictive behaviors.* 1992;17(3):259-71.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Tobacco and Health in the developing world. Brussels, 3-4 fevereiro 2003

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Women on tobacco. Genebra, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Global Health Observatory (GHO) data. Institute for Health Metrics and Evaluation, University of Washington, 2015

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Convenção quadro de controle do tabaco. Dia Mundial Sem Tabaco. Tabaco e Pobreza – Um Círculo Vicioso. 31 de maio de 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tobacco and health in the developing world. Brussels, 3-4. Fev. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Convenção quadro de controle do tabaco- 25 de junho de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tabacco Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/es/index.html> Acesso em: 17/10/2015.



WU, J., BOSTROM, P., SPARKS, L. M., YE, L., CHOI, J. H., GIANG, A. H., et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermo-genic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366–376. doi:10.1016/j.cell.2012.05.016. 2012.

YAMAGUCHI, E. T. et al. Drogas de abuso e gravidez. *Revista. Psiquiatria Clínica*, São Paulo, v. 35, supl. 1, p. 44-47, 2008.

ZONG C., SONG G., YAO S., GUO S., YU Y., YANG Y., GUO Z., QIN S. Cigarette smoke exposure impairs reverse cholesterol transport which can be minimized by treatment of hydrogen-saturated saline. Zong et al. *Lipids in Health and Disease* 14:159 DOI 10.1186/s12944-015-0160-9. 2015.