



ARTIGO ORIGINAL

Efeito da desnutrição e do uso crônico de nicotina durante a gestação sobre a concentração de fosfolipídios pulmonares em ratos recém-nascidos

Effect of malnutrition and chronic use of nicotine during pregnancy on lung phospholipid concentration in neonate rats

Adauto D.M. Barbosa¹, Benjamin I. Kopelman², Olga M.S. Amancio³, Francly R. Patricio⁴

Resumo

Objetivo: Avaliar se o uso crônico de nicotina, imposto à rata gestante, independentemente de seu estado nutricional, influencia a concentração de fosfolipídios pulmonares de seus recém-nascidos.

Métodos: Oitenta ratas “Wistar EPM-1”, após fecundação, e aleatoriamente, foram divididas em 4 grupos controles, que receberam ração normal e água *ad libitum* e sofreram injeção diária de nenhuma substância, 0,15 ml de solução fisiológica, 900 µg/kg de bitartrato de nicotina a 95% e 2.700 µg/kg de bitartrato de nicotina a 95%, respectivamente, e em 4 grupos desnutridas, que receberam 13g/dia de ração e água *ad libitum* e o mesmo tipo de tratamento. No 21º dia de gestação procedeu-se à cesariana, e oitenta recém-nascidos foram selecionados e divididos em 8 grupos de 10 cada, respeitando-se a procedência dos mesmos. Dois pares de pulmões foram extraídos, de cada grupo, para dosagem dos fosfolipídios pulmonares, realizada pelo método de Bartlett.

Resultados: Observou-se aumento na concentração de fosfolipídios pulmonares dos recém-nascidos das ratas que não sofreram desnutrição e receberam nicotina, quando comparada com a dos outros grupos.

Conclusões: O uso crônico de nicotina, imposto à rata gestante, aumenta a concentração dos fosfolipídios pulmonares nos seus recém-nascidos, e a desnutrição influencia esta concentração.

J. pediatr. (Rio J.). 1999; 75(4): 267-270: desnutrição, nicotina, fosfolipídios pulmonares.

Introdução

Efeitos adversos sobre o recém-nascido de ratas submetidas ao uso de nicotina, durante a gravidez, têm sido

Abstract

Objective: The aim of the present study was to determine whether lung phospholipid concentration is affected in neonate rats “Wistar EPM-1” following a continuous 21-day gestational exposure to nicotine.

Methods: Eighty rats “Wistar EPM-1” were randomly divided in four control (diet free and water “ad libitum”) groups (10 rats each): 1 - Control, 2 - Physiologic Solution (infused with 0.15ml of NaCl 0.9%), 3 - Nicotine 1 (infused with 900 µg/kg/day of nicotine bitartrate 95%), and 4 - Nicotine 2 (infused with 2.700 µg/kg/day of nicotine bitartrate 95%), and four undernourished (diet 13g/day and water *ad libitum*) groups (10 rats each), that received the same kind of treatment as the control groups. The infusion of nicotine was subcutaneous. The offspring were divided in eight groups according to their origin.

Results: A significant high lung phospholipid concentration was observed in the non-undernourished nicotized group which was injected with a high dose of nicotine. In the other groups, there was no alteration in that concentration.

Conclusion: We conclude that gestational exposure to nicotine increases lung phospholipid concentration in neonate rats, and that the nutritional state also influences this lung phospholipid concentration.

J. pediatr. (Rio J.). 1999; 75(4):267-270: malnutrition, nicotine, lung phospholipids.

descritos¹⁻⁶, assim como também o impacto da desnutrição da rata grávida sobre seu feto⁷⁻¹⁰.

Diminuição na concentração de fosfolipídios surfactante tem sido verificada em seres humanos fumantes¹¹, mas experimentalmente, em animais, no período gestacional, a ação da nicotina sobre a concentração dos fosfolipídios pulmonares de seus fetos^{12,13} não está ainda bem esclarecida. Assim, este estudo teve o objetivo de avaliar

1. Prof. Adjunto Doutor da Disciplina de Neonatologia da UFF.

2. Prof. Titular da Disciplina de Pediatria Neonatal da EPM.

3. Profª Adjunta Doutora Chefe do Laboratório de Pesquisas do Departamento de Pediatria da EPM.

4. Profª Adjunta Doutora Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Pediatria da EPM.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Pesquisas do Departamento de Pediatria da Escola Paulista de Medicina.

se o uso crônico de nicotina, imposto à rata gestante, independentemente de seu estado nutricional, influenciava a concentração de fosfolípidios pulmonares de seus recém-nascidos.

Material e Métodos

Animais

Oitenta ratas “Wistar EPM-1” que pesavam entre 180 e 220g e estavam em idade reprodutiva (90 dias), escolhidas através do procedimento de numeração dos animais e posterior randomização, com a tábua de números aleatórios, foram aceitas no estudo.

Formação dos grupos e procedimentos

As ratas foram consideradas fecundadas quando, comprovadamente, por visualização, demonstravam presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. O dia da fecundação foi considerado o dia Ø (zero) do período gestacional. Foram divididas, após fecundação, em quatro Grupos Controles, que receberam ração comercial Labina-Purina[®], água “ad libitum” e receberam: 1 - Nenhuma substância [Gestante Controle (GC)]; 2 - Injeção diária de 0,15 ml de solução fisiológica a 0,9% [Gestante Controle Solução Fisiológica (GCSF)]; 3 - Injeção diária de 900 µg/kg de peso de bitartarato de nicotina a 95%, equivalente a 10 cigarros¹⁵ [Gestante Controle Nicotina1 (GCN1)]; 4 - Injeção diária de 2.700 µg/kg de peso de bitartarato de nicotina a 95%, equivalente a 30 cigarros¹⁵ [Gestante Controle Nicotina2 (GCN2)], e em quatro Grupos Desnutridos, que receberam 13 g/dia da mesma ração e que corresponde a 50% da ingesta diária da rata gestante controle¹⁴, água “ad libitum”, e que receberam os mesmos tratamentos: 1 - Gestante Desnutrida (GD); 2 - Gestante Desnutrida Solução Fisiológica (GDSF); 3 - Gestante Desnutrida Nicotina1 (GDN1); e 4 - Gestante Desnutrida Nicotina2 (GDN2).

Nos grupos de ratas em que houve aplicação de nicotina ou solução fisiológica (injetadas desde o dia Ø até 24 horas antes da cesariana e divididas em 2 doses diárias), a via utilizada foi a subcutânea (região dorsal), e o local da aplicação sofreu rodízio constante a fim de se evitar processo ulcerativo local.

Um total de 80 recém-nascidos foi dividido em 8 grupos (10 em cada grupo), respeitando-se a procedência em relação aos grupos das ratas gestantes: 1 - Controle (RNC); 2 - Controle Solução Fisiológica (RNCSF), 3 - Controle Nicotina1 (RNCN1); 4 - Controle Nicotina2 (RNCN2); 5 - Desnutrido (RND); 6 - Desnutrido Solução Fisiológica (RNDSF); 7 - Desnutrido Nicotina1 (RNDN1); e 8 - Gestante Desnutrido Nicotina2 (RNDN2).

A cesariana foi realizada em todas as ratas no 21^o dia de gestação, para a coleta das amostras. Os filhotes, retirados individualmente, foram limpos das membranas e separados da placenta por pinçamento e secção do cordão umbilical, pesados e sacrificados por decapitação.

A solução de bitartarato de nicotina a 95% foi preparada pelo Serviço de Psicofarmacologia da Escola Paulista de Medicina.

Coleta de Amostras

De cada grupo de recém-nascidos, foram retirados dois pares de pulmões colocados imediatamente em N₂ líquido e guardados a -18°C, até que fossem requisitados para dosagem de fosfolípidios, pelo clássico método de Bartlett¹⁶. A concentração destes fosfolípidios foi expressa em µg.fosfato/grama de tecido seco.

Estudo Estatístico

Os dados foram analisados comparando-se as médias aritméticas dos grupos, utilizando-se um delineamento experimental, inteiramente casualizado, com análise de variância, e aplicando-se a estatística paramétrica através do teste F de Brieger: quando significativo, empregou-se o teste de Tukey-Kramer para que fossem verificados os contrastes significativos, adotando-se um nível de significância de 5% de probabilidade, de acordo com Munro e Page, 1993¹⁷. Utilizou-se o programa SPSS 6.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), na computação das análises estatísticas.

Resultados

Os resultados podem ser observados no Quadro 1.

O grupo RNCN2 apresentou maior média de concentração de fosfolípidios pulmonares em relação aos demais grupos ($p < 0,001$), que não mostraram diferença de concentração entre si, com exceção do grupo RNCN1 que mostrou aumento daquela concentração quando comparado aos grupos RNC ($p < 0,01$) e RND ($p < 0,01$).

Discussão

Tem sido observado que, em recém-nascidos pré-termo, humanos, oriundos de mães que utilizam drogas abusivamente, entre as quais nicotina, ocorre diminuição de incidência de síndrome de desconforto respiratório. O mecanismo responsável por isso não está claro. Como o uso crônico de nicotina sobre a supra-renal se faz às custas principalmente da liberação de catecolaminas¹⁸, promovendo aumento de cortisol, esse mecanismo, possivelmente, exerça um efeito importante no aumento de concentração de fosfolípidios pulmonares¹⁹⁻²⁰, contribuindo, desse modo, na maturação do pulmão fetal. Entretanto, estudos em humanos, envolvendo o uso de nicotina, não mostram diferença do nível de cortisol no sangue do cordão, quando comparadas mães fumantes e não fumantes^{21,22}. Nestes trabalhos, os níveis de cortisol foram obtidos ao nascer e podem não refletir possíveis elevações transitórias no feto, intra-útero, logo após cada momento de utilização do

Quadro 1 - Médias de concentração de fosfolipídios pulmonares dos ratos recém-nascidos (em microg. fosf/g tec. seco)

Grupos	Médias	D.P (±)
RNC	284,15	58,31
RNCSF	304,20	36,47
RNCN1	397,97	43,87
RNCN2	547,43	85,97
RND	288,88	66,20
RNDSF	324,63	61,68
RNDN1	304,80	79,32
RNDN2	331,33	78,97

F = 16,738 p < 0,0001 DP = desvio padrão

Teste de Tukey-Kramer:
Quando q > 4,428, então p < 0,05.
(As comparações não efetuadas não foram significativas).

RNCN1 > RNC, RND

RNCN2 > RNC, RNCSF, RNCN1, RND, RNDSF, RNDN1, RNDN2

RNC = recém-nascido controle
RNCSF = recém-nascido controle solução fisiológica
RNCN1 = recém-nascido controle nicotina 1
RNCN2 = recém-nascido controle nicotina 2
RND = recém-nascido desnutrido
RNDSF = recém-nascido desnutrido solução fisiológica
RNDN1 = recém-nascido desnutrido nicotina 1
RNDN2 = recém-nascido desnutrido nicotina 2

alcalóide pela mãe, e assim explicar a influência da nicotina em baixa e alta dose e/ou pequena e grande frequência de utilização, na concentração dos fosfolipídios pulmonares. Ainda assim, são controversos os mecanismos que poderiam explicar o modo pelo qual o abuso materno da nicotina influencia a concentração pulmonar de surfactante.

Nos grupos de ratas deste estudo submetidas à desnutrição, era de se esperar que o estresse aumentasse a concentração dos fosfolipídios pulmonares e que a aplicação de nicotina contribuísse na sua elevação. Entretanto, isso não foi verificado, em parte. Ao que parece, tanto a presença de alterações estruturais teciduais²³, promovidas pela desnutrição, quanto a dose de nicotina injetada na rata gestante influenciam a elevação de concentração.

Em trabalho anterior²³, os autores observaram que a presença de alterações pulmonares tais como enfisema e atelectasia era mais frequente em recém-nascidos oriun-

dos de ratas gestantes desnutridas que receberam altas doses de nicotina, e parecia espelhar a maior vulnerabilidade da estrutura do pulmão desnutrido fetal à ação do alcalóide. Entretanto, neste estudo verificaram que o aumento de concentração de fosfolipídios pulmonares ocorreu naqueles recém-nascidos cujas mães não eram desnutridas e receberam altas doses de nicotina. Algumas hipóteses parecem explicar tal fato. Receptores de glicocorticóides têm sido detectados em todas as espécies de animais, incluindo coelho, rato, camundongo, hamster, ovelha, macaco e, também, no homem²⁴. Sua presença nas células responsáveis pela síntese e estocagem de fosfolipídio surfactante (células tipo II) parece ser necessária à resposta hormonal²⁵⁻²⁷. Além disso, tem sido proposto que os glicocorticóides intensificariam o desenvolvimento pulmonar²⁵ ou pela indução de enzimas envolvidas na biossíntese de fosfolipídios tenso-ativos²⁸, ou através do aumento da biossíntese de lecitina ou de seus precursores^{29,30}. Assim, embora acelerem a diferenciação pulmonar, prejudicam a taxa mitótica³¹, inibindo a síntese de DNA³², reduzindo o número de células. Entre as alterações teciduais^{8,9,15} observadas no desnutrido, que promovem retardo de desenvolvimento pulmonar³³ e diminuição da percentagem de fosfolipídios pulmonares³⁴, possivelmente, resulte também a presença de um menor número de receptores de glicocorticóides³⁵, atuando como fator limitante no processo³⁶. Outras observações, no entanto, levantam a hipótese, em animais com restrição de dieta, que a presença do estresse devido à desnutrição seria capaz de promover aumento de corticóide circulante, elevando a concentração de fosfolipídios surfactante³⁷, através da reutilização de seus componentes, conseqüentemente diminuindo a necessidade de síntese de novas moléculas³⁸. Ao que parece, o uso crônico de nicotina influencia o aumento da concentração de fosfolipídios pulmonares nestes desnutridos. E é possível que aquelas alterações pulmonares se tornem mais pronunciadas por ação direta da nicotina²³, interferindo na síntese e/ou estocagem de fosfolipídios surfactante e, conseqüentemente, na sua concentração, tornando indisponíveis os substratos necessários à síntese destes fosfolipídios. Além disso, em um pulmão estruturalmente comprometido pela desnutrição e pela nicotina, a resposta ao uso nicotínico talvez não seja suficiente para influenciar o aumento de cortisol e estimular a secreção e/ou produção de fosfolipídios pulmonares, ou talvez a ação do glicocorticóide torne-se incipiente por alteração estrutural e/ou redução do número de células que contêm os receptores necessários à resposta, ou ambos. Por fim, baseados nestes argumentos, é possível aceitarmos em parte que o uso de nicotina, em dose elevada, pela rata gestante aumenta, significativamente, a concentração de fosfolipídios pulmonares de seus recém-nascidos. No entanto, nos recém-nascidos de desnutridas, é provável que outros mecanismos, além dos acima propostos, possam interferir no aumento da concentração dos fosfolipídios, como observamos nos do grupo RNDN2.

Referências bibliográficas

1. Sontag LW, Wallace RF. The effect of cigarette smoking during pregnancy upon the fetal heart rate. *Am J Obstet Gynecol* 1935; 29:77-83.
2. Younoszai MK, Pelaso J, Haworth JC. Fetal growth retardation in rats exposed to cigarette during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 104:1207-13.
3. Mau G. Smoking and the fetus. *Lancet* 1976, 1:972.
4. Abel EL. Smoking during pregnancy: a review of effects on growth and development of offspring. *Hum Biol* 1980; 52:593-625.
5. Harrison GC, Branson RS, Vancher YE. Association of maternal smoking with body composition on the newborn. *Am J Clin Nutr* 1983; 38:757-62.
6. Mochizuki M, Maruo T, Masuko K, Ohtsu T. Effects of smoking on fetoplacental-maternal system during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 149:413-20.
7. Winick M, Noble A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr* 1965; 89:300-6.
8. Brasel JA, Winick M. Maternal nutrition and prenatal growth. Experimental studies of effects of maternal undernutrition on fetal and placenta growth. *Arch Dis Child* 1972; 47:479-85.
9. Nóbrega FJ, Tonete SSQ, Sartor MEA, Cury PR. Estudo experimental do crescimento placentário na desnutrição protéico-calórica. *J pediatr (Rio J)* 1979; 46:82-91.
10. Guarner V, Tordet C, Bourbon JR. Effects of maternal protein-calorie malnutrition on the phospholipid composition of surfactant isolated from fetal and neonatal rat lungs. Compensation by inositol and lipid supplementation. *Pediatr Res* 1992; 31:629-35.
11. Finley TN, Landman, AJ. Low yield of pulmonary surfactant in cigarette smokers. *N Engl J Med* 1972; 266:223-27.
12. Babenko NA, Basanets LM, Ezhova AO. Age-related characteristics of lipid changes in the lungs, heart and brain of albino rats in relation to dietary factors. *Fiziol Zh* 1990; 36:59-63.
13. Subramaniam S, Bummer P, Gairola CG. Biochemical and biophysical characterization of pulmonary surfactant in rats exposed chronically to cigarette smoke. *Fundam Appl Toxicol* 1995; 27: 63-69.
14. Hsueh AM, Blackwell RQ, Chow BF. Effect of maternal diet in rats on feed consumption of the offspring. *J Nutr* 1970; 100:1157-64.
15. Nasrat HA, Al-Hachim GM, Mahmood FA. Perinatal effects of nicotine. *Biol Neonate* 1986; 49:8-14.
16. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959; 234:46-68.
17. Munro BH, Page EB. *Statistical Methods for Health Care Research*. 2ª ed. Philadelphia: Lippincott Co.; 1993. p.403.
18. Armitage AK. Effects of Nicotine and Tobacco Smoke on Blood Pressure and Release of Catecholamines from the Adrenal Glands. *Br J Pharmacol* 1965; 25:515-26.
19. Lawson EE, Brown EB, Torday JS. Influence of epinephrine on fetal pulmonary fluid production and surfactant release. *Physiologist* 1977; 20:55.
20. Lawson EE, Brown ER, Torday JS, Madansky DL, Tausch HW Jr. The effect of epinephrine on tracheal fluid flow and surfactant efflux in fetal sheep. *Am Rev Resp Dis* 1978; 118:1023-34.
21. Sybulski S. Umbilical Cord Plasma Levels in Association With Pregnancy Complications. *Obstet Gynecol* 1977; 50: 308-312.
22. Giacomini CB, Procianny RS. Fumo na Gestação. Função da Adrenal Fetal. *J pediatr (Rio J)* 1992; 68:174-177.
23. Barbosa ADM, Kopelman BI, Amancio OMS, Patrício FR. Alterações de peso tecidual e histológicas em ratas gestantes submetidas à desnutrição e ao estresse crônico de nicotina e em seus recém-nascidos. *J pediatr (Rio J)* 1995; 71:145-50.
24. Giannopoulos G. Variations in the levels of cytoplasmic glucocorticoid receptors in lungs of various species at different developmental stages. *Endocrinology* 1974; 94:450-62.
25. Toft D, Chytil F. Receptors for glucocorticoids in lung tissue. *Arch Biochem Biophys* 1973; 157:464-70.
26. Ballard PL. Glucocorticoid receptors in the lung. *Fed Proc* 1977; 36:2660-67.
27. Wang NS, Kotas RV, Avery ME, Thurlbeck WM. Accelerated appearance of osmophilic bodies in fetal lungs following steroid injection. *J Appl Physiol* 1971; 30:362-65.
28. Liggins GC. Premature delivery of fetal lambs infused with glucocorticoid. *J Endocrinol* 1969; 45:515-21.
29. Farrel PM, Lundgun W, Douglas WHJ. Enzymatic synthesis of Phosphatidylcholine (PC) in homogeneous cultures of apparent type II pneumocytes. *Pediatr Res* 1975; 9:276-79.
30. Farrel PM, Blackburn WR, Adams AJ. Lung phosphatidylcholine synthesis and choline phosphotransferase activity in anencephalic rat fetuses with corticosteroid deficiency. *Pediatr Res* 1977; 11:770-82.
31. Carson SH, Talusch HW, Avery ME. Inhibition of lung cell division after hydrocortisone injection into fetal rabbits. *J Appl Physiol* 1973; 34:660-3.
32. Sanfagon R, Possmayer F, Harding PGR. Dexamethasone treatment of guinea pig fetus: its effects on the incorporation of H₃-thymidine into deoxyribonucleic acid. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 127:745-52.
33. Curle DC, Adamson LJR. Retarded development of neonatal rat lung by maternal malnutrition. *J Hist Cytochem* 1978; 26:401-8.
34. Gross, I. Nutritional and hormonal influences on lung phospholipid metabolism. *Fed Proc* 1977; 36:2665-69.
35. Goerke J. Lung Surfactant. *Biochim Biophys Acta* 1974; 344: 241-61.
36. Sahebhami H, MacGee J. Effects of starvation and refeeding on lung biochemistry in rats. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126:483-87.
37. Abe M, Tierney DF. Lung lipid metabolism after 7 days of hydrocortisone administration to adult rats. *J Appl Physiol: Respir Environ Exerc Physiol* 1977; 42:202-5.
38. Brown LAS, Bliss AS, Longmore WJ. Effect of nutritional status on the lung surfactant system: food deprivation and caloric restriction. *Exp Lung Res* 1984; 6:133A7.

Endereço para correspondência:

Dr. Adauto Dutra Moraes Barbosa

Rua Átila Nunes, 238 - Piratininga

Niterói - RJ - CEP 24350-490

Fones: (21) 620-3330 / 9994-0328 - Fax: (21) 610-9713

E-mail: adutra@web4u.com.br