

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

GISELA VICENTINI DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMAÇA DE CIGARRO
SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS GASOMÉTRICOS E
DESEMPENHO FÍSICO EM RATOS**

VITÓRIA
2014

GISELA VICENTINI DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMAÇA DE CIGARRO
SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS GASOMÉTRICOS E
DESEMPENHO FÍSICO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Educação Física, Centro de Educação Física e Desportos, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Educação Física, na área de concentração fisiologia, bioquímica e exercício em modelos experimentais.

Orientador: Prof. Dr. Edson Castardeli.

VITÓRIA
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Souza, Gisela Vicentini de, 1984-
S729i Influência da exposição aguda à fumaça de cigarro sobre
parâmetros bioquímicos gasométricos e desempenho físico em
ratos / Gisela Vicentini de Souza. – 2014.
58 f. : il.

Orientador: Edson Castardeli.
Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Educação Física e
Desportos.

1. Fumo - Vício. 2. Aptidão física – Avaliação. 3. Gasometria.
I. Castardeli, Edson. II. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Educação Física e Desportos. III. Título.

CDU: 796

GISELA VICENTINI DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMAÇA DE CIGARRO
SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS GASOMÉTRICOS E
DESEMPENHO FÍSICO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Educação Física do Centro de Educação Física e Desportos da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Educação Física na área de concentração fisiologia, bioquímica e exercício em modelos experimentais.

Aprovada em 04 de abril de 2014.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Castardeli
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof^a. Dr^a. Suely Gomes de Figueiredo
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Wellington Lunz
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Aos meus **pais Ailton e Lúcia**, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, e por sempre acreditar na concretização desta etapa. Aos meus familiares, irmã **Gabriela** e cunhado **Fernando**, pela ajuda e participação essencial. Ao **Saul**, que enfrentou ao meu lado todos os momentos difíceis, Obrigada!

Ao meu orientador **Prof. Dr. Edson Castardeli**, por toda a confiança depositada no meu trabalho e pelas oportunidades concedidas, além de todo conhecimento compartilhado e orientações durante todo o tempo. E claro pela sua paciência!

A todos os professores do laboratório LAFIBE da Universidade Federal do Espírito Santo, que me apoiaram de alguma forma na construção da minha dissertação. Quero agradecer a professora **Dra. Márcia Regina de Holanda**, a professora **Dra. Ana Paula Lima Leopoldo**, o professor **Dr. André S. Leopoldo**; Muito obrigado pelos conselhos.

Gostaria de agradecer ao professor **Dr. José Geraldo Mill**, por permitir e colaborar com o desenvolvimento da minha pesquisa. Muito obrigada! Ao **Enildo Broeto** pelo apoio técnico excepcional. Ao professor **Dr. Hélder Mauad** e ao professor **Dr. Wellington Lunz**, pela contribuição no meu exame de qualificação.

Aos amigos do laboratório vizinho BIMOR pela disponibilidade e colaboração dos cafezinhos da tarde, **Edna, Kuxa** e professora **Dra. Karine Sarro**.

Aos companheiros do laboratório **Felipe, Jóctan, Vitor e Bruno**. Em especial aos amigos **Paula Grippa** e **Artur** por terem colaborado efetivamente na coleta de dados. E pela nova amizade adquirida no mestrado à amiga **Vanessa**. Muito obrigada!

Aos funcionários, professores e colegas da pós-graduação em Educação Física pelo convívio e conhecimento compartilhado ao longo deste período.

Obrigada a todos!

*"Dizem que antes de um Rio entrar no Mar, ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada que percorreu, para os cumes, as montanhas, para o longo caminho sinuoso que trilhou através de florestas e povoados, e vê à sua frente um Oceano tão vasto, que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O Rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. **Voltar é impossível na existência.** O Rio é compelido pela própria força que o ANIMA, a se arriscar e entrar no Oceano. E somente quando ele entra no Oceano é que o medo desaparece, porque apenas então o Rio percebe que não se trata de desaparecer no Oceano, mas de se tornar Oceano.*

Por um lado é desaparecimento e por outro lado é renascimento.

Assim somos nós.

Só podemos ir em frente e arriscar.

Coragem !! Avance firme e torne-se Oceano!!!"

Osho Bhagwan Shree Rajneesh

RESUMO

Introdução. O fumo causa o desenvolvimento de doenças, promove o aumento no risco de agravos cardiovasculares e pode provocar até a morte súbita. Fumantes são expostos a altas concentrações de monóxido de carbono presente na fumaça de cigarro, promovendo a redução na oxigenação nos tecidos musculares com potencial para causar prejuízo da capacidade aeróbia e hipóxia. **Objetivos.** Investigar o curso temporal das alterações bioquímicas gasométricas e avaliar se as alterações bioquímicas induzidas pela EFC se associam ao desempenho físico de ratos submetidos ao teste físico de natação. **Metodologia.** Ratos Wistar machos foram distribuídos em dois grupos: Controle (C, n=8) e expostos agudamente à fumaça de cigarro (EFC), subdivididos em três grupos Mo 1 (0-30min pós EFC, n=11), Mo 2 (30-60min pós EFC, n=14) e Mo 3 (60-120min pós EFC, n=10), por período de oito dias consecutivos. Todos os animais foram pesados antes e após o período experimental, bem como submetidos à avaliação de desempenho em teste físico de natação e análise hemogasométrica do sangue arterial, as amostras de sangue foram obtidas através do cateterismo da artéria carótida. **Resultados.** Encontramos redução no peso corporal dos animais EFC comparado aos animais Controle (C=524,6±12,1g; Mo 1=463,3±10,9g; Mo 2=482,8±9,2g; Mo 3=499,3±9,8g). Os valores da análise hemogasométrica apresentaram-se com aumento significativo para as concentrações de Carboxihemoglobina (C=0,0±0,0%; Mo 1=25,4±0,6%; Mo 2=13,6±0,5%; Mo3=8,2±0,7%), com diferença estatística entre os grupos ($p=0,001$); Para Metemoglobina (C=0,1±0,1%; Mo 1=1,9±0,3%; Mo 2=0,4±0,1%; Mo 3=0,3±0,1%) houve diferença estatística entre o grupo Mo1 quando comparado ao grupo C ($p=0,001$); A Saturação de Oxigênio (C=78,2±1,5%; Mo 1=91,4±2,0%; Mo 2=87,1±1,8%; Mo 3=84,5±2,9%) apresentou diferença estatística entre os grupos Mo 1 e Mo 2 comparado ao grupo C ($p=0,003$); Para Desoxi-hemoglobina (C=21,90±1,5%; Mo 1=6,33±1,5%; Mo 2=11,31±1,5% e Mo 3=15,25±2,4%), houve redução significativa entre os grupos Mo 1 e Mo 2 comparado ao grupo C ($p=0,001$); Para Lactato (C=1,71±0,2mmol/L; Mo 1=2,62±0,2mmol/L; Mo 2=1,79±0,1mmol/L; Mo 3=1,54±0,0mmol/L), houve aumento significativo entre o grupo Mo 1 comparado ao grupo C ($p=0,012$). Para a avaliação de desempenho em teste físico de exaustão em natação, não houve diferença estatística no tempo de animais EFC comparado aos animais controle (C=373,0±39,8s; Mo 1=273,0±15,9s; Mo 2=298,5±23,0s; Mo

3=318,4±24,2s). Observamos nos animais EFC associação significativa ($p=0,001$, $r=0,886$) entre maior valor de carboxihemoglobina com menor tempo de coleta sanguínea. **Conclusão.** A exposição aguda à fumaça de cigarro provoca alterações em parâmetros bioquímicos gasométricos e prejudica o transporte de oxigênio. No modelo exposição aguda à fumaça de cigarro utilizado neste trabalho, não encontramos prejuízo no desempenho físico em ratos EFC submetidos ao teste físico de exaustão em natação.

Palavras-chave: Tabagismo; Avaliação de Desempenho; Gasometria; Hipóxia.

ABSTRACT

Introduction. The smoke causes the development of diseases, promotes increased risk of cardiovascular diseases and can cause even sudden death. Smokers are exposed to high carbon monoxide concentrations present in cigarette smoke, promoting the reduction in oxygen in muscle tissues with the potential to cause loss of aerobic capacity and hypoxia. **Objective.** To investigate the time course of blood gas biochemical changes and assess whether the biochemical changes induced by EFC are associated with physical performance of rats submitted to physical test of swimming. **Methodology.** Male Wistar rats were divided into two groups: control (C, n=8) and acutely exposed to cigarette smoke (EFC), divided in three groups Mo 1 (0-30min post EFC, n=11), Mo 2 (30 -60min post EFC, n=14) and Mo 3 (60-120min post EFC, n=10), for eight consecutive days. All animals were weighed before and after the trial period, and subjected to performance evaluation for swimming physical test and hemogasometric analysis of arterial, blood samples were obtained by catheterization of the carotid artery. **Results.** Found reduction in body weight of the animals EFC compared to control animals (C=524.6± 12,1g; Mo 1=463.3±10,9g; Mo 2=482.8±9.2g; Mo 3=499.3±9,8g). The values of hemogasometric analysis is presented with a significant increase for the concentration of carboxyhemoglobin (C=0.0±0.0%; Mo 1=25.4±0.6%; Mo 2=13.6±0.5%; Mo 3=8.2± 0.7%), with statistical difference between groups (p=0.001); For Methemoglobin (C=0.1±0.1%; Mo 1=1.9±0.3%; Mo 2=0.4±0.1%; Mo 3=0.3±0.1%) was no statistical difference between Mo 1 group compared to the C group (p=0.001); The Oxygen Saturation (C=78.2 ± 1.5%; Mo 1=91.4±2.0%; Mo 2=87.1±1.8%; Mo 3=84.5±2.9%) had statistical difference between Mo 1 and Mo 2 groups compared to C group (p=0.003); For deoxy-hemoglobin (C=21.90±1.5%; Mo 1=6.33±1.5%; Mo 2=11.31±1.5% and Mo 3=15.25±2.4%) was reduced significant among Mo 1 and Mo 2 groups compared to C group (p=0.001); For Lactate (C=1.71±0,2mmol/L; Mo 1=2.62±0,2mmol/L; Mo 2=1.79±0,1mmol/L; Mo 3=1.54±0,0mmol/L), a significant increase between Mo 1 group compared with C group (p=0.012). For the evaluation of performance in physical exhaustion test in swimming, there was no statistical difference in the animals time EFC compared to control animals (C=373.0±39,8s; Mo 1=273.0±15,9s; Mo 2=298.5±23,0s; Mo 3=318.4±24,2s). We note the significant association EFC

animals ($p=0.001$, $r=0.886$) between higher value carboxyhemoglobin with shorter blood collection. **Conclusion.** Acute exposure to cigarette smoke causes changes in blood gas and biochemical parameters affect the transport of oxygen. In the model acute exposure to cigarette smoke used in this work, we found impairment in physical performance in EFC rats subjected to physical exhaustion test in swimming.

Keywords: Smoking, Performance Evaluation; Blood Gas Analysis; Hypoxia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da hemoglobina.....	18
Figura 2 - Equilíbrio Ácido-Base.....	22
Figura 3 - Desenho experimental da pesquisa.....	26
Figura 4 - Piscina utilizada no experimento.....	27
Figura 5 - Esquema do período de adaptação dos animais ao meio líquido.....	28
Figura 6 - Aparato de exposição à fumaça de cigarro.....	28
Figura 7 - Representação esquemática do período de EFC.....	29
Figura 8 - Gasômetro ABL 800 Flex e amostra sanguínea.....	32
Figura 9 - Peso corporal antes e após a EFC.....	34
Figura 10 - Avaliação de desempenho.....	35
Figura 11 - Concentração total de hemoglobina.....	36
Figura 12 - Concentração de hematócitos.....	37
Figura 13 - Saturação de oxigênio.....	38
Figura 14 - Fração de oxihemoglobina em hemoglobina total.....	39
Figura 15 - Fração de dexosi-hemoglobina em hemoglobina total.....	40
Figura 16 - Fração de metemoglobina em hemoglobina total.....	41
Figura 17 - Fração de carboxihemoglobina em hemoglobina total.....	42
Figura 18 - Lactato.....	43
Figura 19 - Correlação da coleta sanguínea versus COHb.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de pH e pCO ₂ no sangue.....	36
Tabela 2- Valores de HCO ₃ ⁻ , cBase e ctCO ₂ no sangue.....	44

LISTA DE SIGLAS

BPM - Batimentos por minuto
cBase - Excesso de base
ctCO₂ - Concentração total de Dióxido de Carbono
CO - Monóxido de carbono
CO₂ - Dióxido de carbono
COHb - Carboxihemoglobina
ctHb - Concentração total de hemoglobina
disHb - Dishemoglobinas
EAB - Equilíbrio ácido-base
EFC - Exposição aguda à fumaça de cigarro
FCOHb - Fração de Carboxihemoglobina em relação a hemoglobina total
Fe²⁺ - Ferro no estado ferroso
Fe³⁺ - Ferro no estado férrico
FHHb - Fração de Desoxihemoglobina em relação a hemoglobina total
FMetHb - Fração de Metemoglobina em relação a hemoglobina total
FO₂Hb - Fração de oxihemoglobina em relação a hemoglobina total ou Saturação Fracional da Hemoglobina
H⁺ - íons de hidrogênio
HcT_c - Concentração de hematócrito
Hb - Hemoglobina
HCO₃⁻ - Bicarbonato
H₂CO₃ - Ácido carbônico
HHb - Desoxi-hemoglobina
O₂Hb - Oxihemoglobina
O₂ - Oxigênio
Lac - Lactato
MetHb - Metemoglobina
NADH-MR - Dinucleótido de nicotinamida e adenina metemoglobina redutase
PC - Peso Corporal
pCO₂ - Pressão de dióxido de carbono
pO₂ - Pressão parcial de Oxigênio
sO₂ - Saturação de Oxigênio
SNC - Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Tabagismo.....	14
1.1.1. Fumo e seus constituintes.....	15
1.1.2. Fumo e desempenho físico.....	17
1.2. Hemoglobina e suas propriedades bioquímicas.....	17
1.2.1. Dishemoglobinas.....	19
1.3. Equilíbrio ácido-base.....	21
1.3.1. Lactato.....	22
2. OBJETIVO	24
2.1. Objetivos Específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Animais.....	25
3.2. Protocolo Experimental.....	25
3.3. Peso Corporal.....	26
3.4. Adaptação ao meio líquido.....	27
3.5. Exposição aguda à fumaça de cigarro.....	28
3.6. Avaliação de desempenho em teste físico de natação.....	29
3.7. Coleta sanguínea e análise gasométrica.....	30
3.8. Eutanásia.....	32
3.9. Análise Estatística.....	32
3.10. Limitação experimental dos métodos.....	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Peso corporal.....	34
4.2. Avaliação de desempenho.....	35
4.3. Análise hemogasométrica.....	35
4.3.1. Gases no sangue.....	35
4.3.2. Oximetria.....	36
4.3.3. Metabólicos.....	43
4.3.4. Estado ácido-base.....	44
4.4. Correlação de tempo da coleta sanguínea versus valores de COHb.....	45

5. DISCUSSÃO	46
5.1. Peso corporal.....	46
5.2. Avaliação de desempenho.....	46
5.3. Análise hemogasométrica.....	49
5.4. Correlação de tempos de coleta sanguínea versus COHb.....	52
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tabagismo

O fumo é considerado importante fator predisponente de doenças e eleva o risco de morte súbita. O tabagismo é considerado um vício sendo reconhecido como doença crônica gerada pela dependência da nicotina e está inserido na Classificação Internacional de Doenças (CID-10)¹. Existem basicamente dois tipos de tabagismo: ativo, caracterizado pela fumaça inalada pelo fumante durante o ato de fumar; e o passivo, a fumaça é inalada por indivíduos não fumantes em ambientes fechados².

As consequências do uso do tabaco incluem efeitos deletérios em vários tecidos, desde doenças pulmonares de pouca gravidade até alterações celulares que predispõem ao câncer, além das alterações cardíacas e vasculares. É responsável pelo desenvolvimento de comorbidades com alta contribuição para a mortalidade³. A exposição crônica à fumaça de cigarro induz o desenvolvimento de doenças pulmonares e remodelação cardíaca comprometendo a função do coração⁴⁻⁵. Estima-se que cerca de seis milhões de pessoas morrem a cada ano pelo uso do tabaco, tanto por utilização do fumo ativo quanto passivo. Se o ritmo atual continuar, o número de mortes por cigarro deve subir para 8 milhões em 2030⁶, sendo considerado um importante problema de saúde pública.

São atribuíveis ao consumo de tabaco aproximadamente, 70% dos cânceres de pulmão, 42% das doenças respiratórias crônicas e cerca de 10% das doenças do aparelho circulatório⁷. Dentre os fatores de risco conhecidos, o fumo é responsável por cerca de 9% das mortes no mundo, enquanto, outros fatores como a inatividade física (6%) e a obesidade (5%) apresenta-se com menores porcentagens se comparados ao tabagismo⁷. Por outro lado, o abandono do vício de fumar aumenta a expectativa e a qualidade de vida em qualquer faixa etária, inclusive entre os indivíduos que já desenvolveram alguma doença⁸.

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (MS), em 2012, foram gastos R\$ 12 milhões com o tratamento de doenças causadas pelo tabagismo. No primeiro semestre de 2013 foram gastos R\$ 12 milhões com o Programa Nacional de

Controle do Tabagismo no Sistema Único de Saúde (SUS)⁹. O Brasil adotou medidas para combater e controlar o uso do tabaco, proibindo a vinculação de propagandas com o intuito de promover o tabaco e seus derivados; e proíbe o consumo de tabaco em ambientes fechados de uso público. Mesmo com medidas de combate ao tabaco, calcula-se que 15% da população adulta brasileira ainda faça uso e aproximadamente 200 mil brasileiros morrem por ano pelo uso do tabaco^{6,10}.

1.1.1. Fumo e seus constituintes

A fumaça do cigarro é uma mistura complexa de aproximadamente 6.700 substâncias, das quais 4.720 são bem identificadas quimicamente¹¹. As substâncias encontradas na fumaça de cigarro são provenientes de aditivos químicos e do papel usado no processo de industrialização. A fumaça do cigarro pode ser classificada em duas vias: a primeira via considerada a principal (*mainstream*), onde estão presentes todos os constituintes gerados durante a queima, que passa pelo filtro no momento da aspiração, fumaça inalada pelo fumante ativo; a segunda via, produzida pela queima da ponta do cigarro, que em combustão é liberada para o ambiente (*sidestream*), fumaça inalada pelo fumante passivo^{11,12}.

Durante a combustão dos gases no fumo ativo, são observadas quatro partes principais dos constituintes do complexo aerossol: na fase de vapor o monóxido de carbono (CO) e dióxido de carbono (CO₂); na fase de partículas a nicotina e o alcatrão.

O CO pertence ao grupo dos poluentes gasosos, é inodoro, incolor e insípido. Possui elevada taxa de difusão quando liberado em ambientes fechados ou espaços confinados, o que aumenta o seu poder de intoxicação¹³. Quando inalado o monóxido de carbono possui cerca de 250 vezes maior afinidade pela hemoglobina do que o oxigênio, formando, assim a Carboxihemoglobina (COHb). A toxicidade do CO é, em parte, efeito da ligação do CO à hemoglobina (Hb), formando COHb, esta formação ocorre devido ao aumento nos níveis da concentração sanguínea de CO. Esse fenômeno dificulta o transporte e liberação do oxigênio aos diversos tecidos, podendo levar a hipóxia tecidual, devido à redução da oxigenação nos tecidos¹⁴. O CO é liberado para o meio ambiente como um dos resíduos da combustão

incompleta de materiais que contêm carbono. Suas fontes de liberação são numerosas, como exemplos, veículos automotivos, aquecedores a óleo, churrasqueiras e fogões a gás, e a queima de tabaco. A fumaça do cigarro contém uma alta concentração de CO (10mg/cigarro), de modo que fumantes apresentam níveis elevados de COHb, 5-15% em fumantes e 0,5 a 3% em não fumantes¹⁵.

O CO₂ é um gás que participa do processo de trocas gasosas e nesse processo permite que o sangue seja oxigenado, em seguida seja direcionado ao átrio esquerdo e conseqüentemente ejetado pelo ventrículo esquerdo para a circulação sistêmica, a fim de atender a demanda metabólica¹⁶. O aumento na concentração sanguínea de CO₂ produzidos metabolicamente pode provocar redução da oxigenação¹⁷.

A Nicotina é considerada uma droga psicoativa, sendo responsável pela dependência química do fumante^{1,18}. Estudos apontam que a nicotina também influencia a inibição do apetite, devido sua atuação no sistema nervoso central (SNC)¹⁸. Seu efeito no SNC estimula a produção de adrenalina, catecolaminas, vasopressina e outros hormônios, que desencadeiam o aumento da frequência cardíaca e na vasoconstrição, elevando a pressão arterial. Após a liberação pelos rins dos metabólitos cotinina e nicotina-n-óxido, são observadas redução da frequência cardíaca, da pressão sanguínea e dos níveis de catecolaminas. Outro efeito é a maior adesividade plaquetária, que juntamente com CO, contribui para o desenvolvimento da aterosclerose¹⁹. Todos esses efeitos resultam em um ambiente desfavorável à oxigenação dos tecidos em relação à razão oferta-demanda²⁰.

O alcatrão é um resíduo negro e viscoso composto por 43 substâncias químicas comprovadamente carcinogênicas. Entre as substâncias, incluem o arsênico, níquel, benzopireno e cádmio. Considerado um agente altamente carcinogênico, sendo responsável pela incidência de cânceres de pulmão, boca, laringe, esôfago, estômago, próstata, bexiga e cólon, entre outros^{14,66}.

1.1.2. Fumo e desempenho físico

As estimativas são que 3,2 milhões de pessoas morrem a cada ano devido à inatividade física. Pessoas que são insuficientemente ativas apresentam cerca de 20 a 30% aumento no risco das causas de mortalidade⁶. O exercício físico promove benefícios ao sistema cardiovascular como hipertrofia cardíaca fisiológica, vascularização cardíaca e aumento do número de capilares⁵. Dessa forma, os benefícios promovidos pelo exercício físico possuem potencial para atenuar os efeitos deletérios do tabagismo ao organismo^{5,21}.

O exercício físico aumenta a atividade metabólica no organismo, e conseqüentemente o consumo de oxigênio. Durante o exercício físico pode ocorrer hipoxemia tecidual devido a fatores relacionados ao transporte de oxigênio, limitação da capacidade de difusão, diferença na relação ventilação/perfusão, intensidade do exercício e a massa muscular envolvida na atividade²¹. Em indivíduos fumantes a hipoxemia tecidual durante o exercício, pode ser agravada devido ao desequilíbrio no conteúdo arterial de oxigênio e variações do pH sanguíneo, uma vez que, estudos apontam de forma consistente que o consumo máximo de oxigênio e a capacidade anaeróbia apresentam-se reduzidos em fumantes de várias idades^{22,23}.

1.2. Hemoglobina e suas propriedades bioquímicas

A hemoglobina (Hb) é uma proteína conjugada globular localizada no interior dos glóbulos vermelhos responsável pelo transporte do oxigênio aos tecidos. Possui estrutura molecular tetramérica, onde a parte protéica da hemoglobina (globina) é composta por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias do tipo alfa (α) com 141 aminoácidos, e duas cadeias do tipo beta (β) com 146 aminoácidos. Cada cadeia polipeptídica da hemoglobina liga-se a um grupo prostético chamado heme, que é formado por um anel pirrólico de protoporfirina IX, que contém em seu centro um átomo de ferro mantido no estado reduzido ou ferroso (Fe^{2+}). Esses quatro átomos de ferro são os centros funcionais da Hb, onde a ligação frouxa e reversível entre o ferro central e o O_2 é o mecanismo pelo qual ocorre o transporte do oxigênio

aos tecidos^{24,25}. A figura 1 ilustra a molécula de hemoglobina e seus centros funcionais.

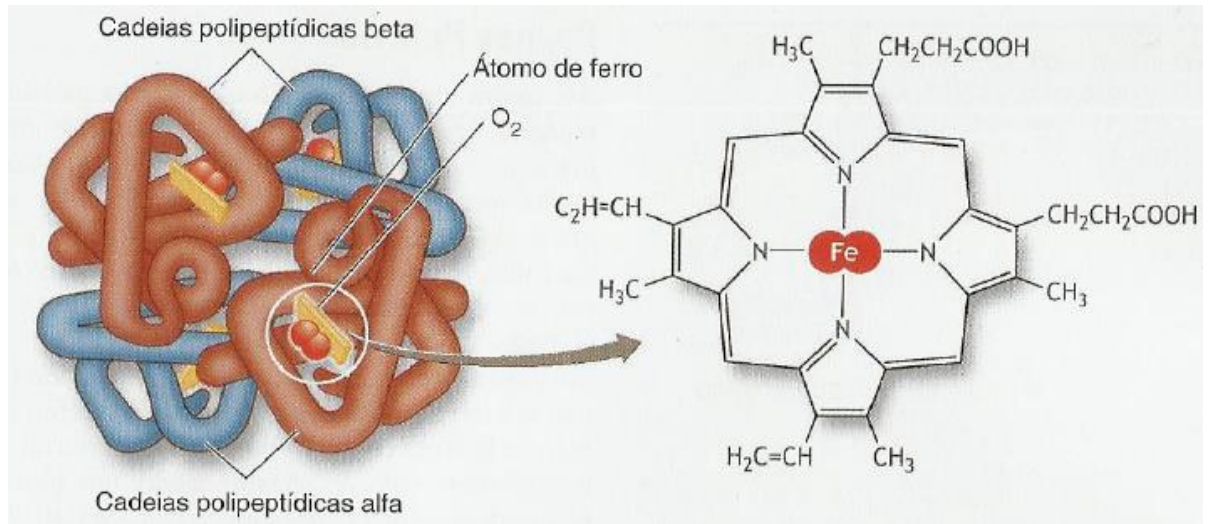


Figura 1 - Estrutura da hemoglobina (Adaptada: MacArdle,2001)²⁶.

A Hb tem como principal função o transporte de O_2 , proveniente dos pulmões para os tecidos, ao mesmo tempo em que facilita a eliminação do CO_2 em sentido inverso. Cada Hb pode transportar quatro moléculas de O_2 , uma para cada um de seus quatro grupos heme, o grau de saturação destes sítios de ligação do oxigênio pode variar de zero, onde todos os sítios estão vazios, a totalmente oxigenada, onde todos os quatro sítios estão ligados a uma molécula de O_2 . A Hb possui dois estados conformacionais, os quais apresentam diferente afinidade para o O_2 : o estado de desoxi-hemoglobina (HHb) que possui baixa afinidade pelo oxigênio, portanto, sendo menos ativo (Forma Rígida ou Tensionada - T) e o estado mais ativo o de oxiemoglobina (O_2 Hb) que possui alta afinidade pelo oxigênio (Forma Relaxada - R)²⁷.

As condições do meio podem provocar alterações no sentido de favorecer a passagem de um estado para o outro. Uma série de fatores ambientais determinam o estado da Hb e sua afinidade relativa pelo O_2 . O microambiente do pulmão, a concentração de O_2 é alta, o que favorece a formação da O_2 Hb, ou seja, a Hb encontra-se praticamente saturada ou carregada de oxigênio. Em contrapartida nos tecidos periféricos, ocorre alteração conformacional na estrutura da Hb que reduz a sua afinidade pelo O_2 , permitindo que a oxiemoglobina libere a maior parte do seu

O₂ para a utilização no metabolismo oxidativo dos tecidos. A capacidade da Hb de se ligar reversivelmente ao O₂ é influenciada pela pressão parcial de oxigênio (pO₂), o pH do ambiente, a pressão parcial de dióxido de carbono (pCO₂) e pela disponibilidade de 2,3-difosfoglicerato. Esses componentes são chamados de efetores alostéricos, pois sua interação com um sítio na molécula da Hb afeta a ligação do O₂ aos grupos heme em outras regiões da molécula²⁷.

Os efeitos alostéricos produzidos por esses componentes são: as interações heme-heme, onde a ligação cooperativa positiva do O₂ permite à Hb liberar mais O₂ aos tecidos em resposta a variações relativamente pequenas de pO₂; o efeito Bohr, ocorre quando o pH diminui ou quando a pCO₂ está aumentada favorecendo a liberação do O₂ pela Hb; o 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), diminui a afinidade da Hb pelo O₂ por ligar-se a desoxi-hemoglobina mas não à oxiemoglobina, em condições de hipóxia o 2,3-DPG encontra-se aumentado a fim de permitir maior descarga de O₂ nos capilares dos tecidos; a ligação do dióxido de carbono (CO₂) a Hb estabiliza a desoxi-hemoglobina, resultando em um decréscimo de sua afinidade pelo O₂; e por fim a ligação do monóxido de carbono (CO) a Hb, faz com que a Hb seja incapaz de liberar O₂ para os tecidos²⁷. Dessa forma a concentração elevada de qualquer destes fatores reduz a afinidade da Hb pelo O₂.

1.2.1. Dishemoglobinas

A hemoglobina pode sofrer alterações químicas transitórias, resultantes da ação de drogas (nitratos, óxido nítrico) ou de exposição a agentes químicos (nitritos, fumaça de cigarro), que contribuem para a formação da dishemoglobina (disHb), ou seja, espécie de Hb que não se liga ao O₂; a metemoglobina (MetHb) e carboxihemoglobina (COHb), são espécies de disHb. Essas duas espécies são funcionalmente deficientes, o aumento da quantidade de qualquer uma delas na corrente sanguínea pode comprometer o fornecimento de O₂ aos tecidos²⁸.

A formação da COHb é decorrente do aumento da concentração sanguínea de CO em fumantes, como consequência, eleva a concentração de COHb, esse aumento significa diminuição proporcional na quantidade de oxigênio disponível para o metabolismo celular²⁹. O CO atravessa a membrana alveolar e liga-se à

hemoglobina no mesmo local de ligação do O_2 , no ferro do heme, deslocando o O_2 da Hb através da seguinte reação: $O_2Hb + CO \rightarrow COHb + O_2$. O CO possui maior afinidade pela Hb, se comparado com o O_2 , o que torna difícil reverter o equilíbrio da equação a favor da ligação do O_2 . Além disso, existe redução de locais de ligação disponíveis para o oxigênio na Hb, que diminui a disponibilidade de O_2 para os músculos³⁰. A ligação do CO em um dos quatro sítios da heme muda a conformação da Hb para a forma "R" ou O_2Hb , fazendo com que os outros sítios restantes liguem-se fortemente ao O_2 , impedindo a liberação do O_2 aos tecidos, deslocando a curva de dissociação da Hb para a esquerda¹⁵.

A MetHb é uma Hb anormal na qual o ferro da Hb não oxigenada está em estado férrico (Fe^{3+}), e não em estado ferroso (Fe^{2+}). Com o ferro oxidado, a Hb é incapaz de transportar O_2 ou CO_2 , uma vez que, o O_2 só se liga a molécula de Hb no estado ferroso³¹. A formação de MetHb reduz a capacidade de transporte de O_2 do sangue, visto que, é incapaz de transportar moléculas de O_2 e porque desvia a curva de dissociação da oxiemoglobina para a esquerda. Este desvio aumenta a afinidade da Hb restante ao O_2 , ou seja, a Hb liga-se às moléculas de O_2 mais eficientemente, mas é menos capaz de liberá-lo aos tecidos, resultando em hipóxia tecidual devido a dois fatores: diminuição da Hb livre para transportar o O_2 e dificuldade de liberação de O_2 para os tecidos^{28,32}. A Hb sofre constantemente oxidação à MetHb; entretanto, os sistemas redutores naturais mantêm os níveis de MetHb abaixo de 2%. O principal responsável pela redução endógena da MetHb, correspondendo a 99% da atividade redutora, do complexo NADH metemoglobina redutase (NADH-MR), um sistema com duas enzimas, que são o citocromo B5 e citocromo B5-redutase (CB5R). A NADH-MR transfere um elétron do NADH para a MetHb, transformando-a em hemoglobina reduzida (HHb)³³. A formação da MetHb pode ocorrer no metabolismo da Hb, como em situações agudas de desequilíbrio nas reações de redução e oxidação (desequilíbrio redox) induzidas pela exposição de diversos agentes químicos³⁴ ou pela diminuição da atividade das enzimas redutoras (redução do metabolismo)³³.

1.3. Equilíbrio ácido-base

O metabolismo celular está associado à produção contínua de íons de hidrogênio (H^+) e de CO_2 , ambos podem alterar o pH sanguíneo. Para que seja mantida a estabilidade do meio interno, deve haver equilíbrio entre a produção e a remoção de H^+ em nosso organismo, a quantidade de H^+ extracelular é mantida dentro de limites estreitos, varia de 35 a 45 mEq/L, o que confere um pH entre 7,35 e 7,45^{35,37}. O pH corresponde a uma escala logarítmica que expressa a concentração real de H^+ de uma solução, sendo inversamente proporcional à concentração hidrogeniônica. Desse modo o aumento de H^+ reduz o pH, enquanto a diminuição de H^+ , o eleva. Portanto, a atividade dos H^+ em uma solução determina a sua acidez, valores superiores a 7,45 indica redução da concentração de H^+ (alcalose) e valores inferiores a 7,35 indica aumento da concentração de H^+ (acidose)^{36,37}.

A concentração do H^+ é mantida relativamente constante por meio de soluções-tampões que resistem a alterações bruscas de pH quando adicionadas quantidades relativamente pequenas de ácido (H^+) ou base (OH^-). São formados por ácidos fracos e suas bases conjugada, os três tampões mais importantes são: o sistema tampão bicarbonato (ácido carbônico/bicarbonato HCO_3^-/H_2CO_3), o sistema tampão fosfato $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ (dihidrogeno fosfato/hidrogeno fosfato) e o tampão proteína (Albumina e Hemoglobina). Entre os tampões do espaço extracelular, o bicarbonato e as proteínas plasmáticas desempenham papel relevante, enquanto a hemoglobina e o sistema fosfato estão em primeiro plano no compartimento intracelular. O sistema tampão bicarbonato possui grande importância nos mamíferos, uma vez que, atua no sangue quase no limite de seu poder tamponante e por ter dois componentes que podem ser regulados o CO_2 e o HCO_3^- . O dióxido de carbono é ajustado por alterações na velocidade da respiração. Enquanto, o teor de bicarbonato é regulado pelos rins. O sistema tampão bicarbonato é formado por um ácido carbônico (H_2CO_3) e uma base a ele conjugada, o HCO_3^- , cuja finalidade é de minimizar alterações na concentração de H^+ de uma solução. Sendo assim, a base fraca liga-se aos H^+ dissociados de um ácido forte, para formar um ácido fraco pouco dissociável, tamponando e, portanto, minimizando as alterações na concentração de H^+ . Além disso, um sistema tampão também pode doar H^+ ³⁶. A figura 2 ilustra o equilíbrio ácido-base.

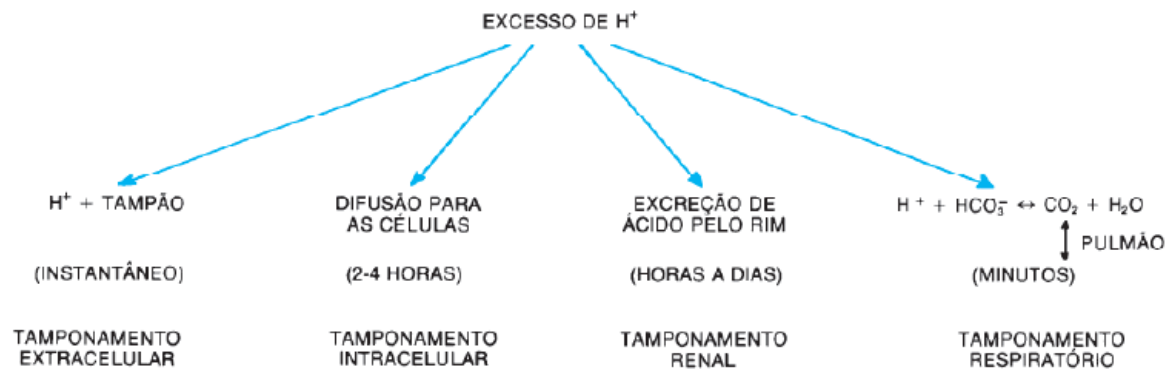


Figura 2 - Mecanismos de defesa frente a um excesso de ácido. Quando ocorre alcalose, as reações se processam em sentido inverso (Adaptado de Makoff, 1972)¹⁷.

Variações na concentração de H⁺ produzem grande impacto sobre as funções celulares, pois quase todos os sistemas enzimáticos de nosso organismo e proteínas envolvidas na coagulação e contração muscular são influenciados pela concentração de H⁺. As alterações primárias do estado ácido-básico são: Acidose metabólica: quando o HCO₃⁻ diminui e a concentração de H⁺ aumenta; Alcalose metabólica: quando o HCO₃⁻ estiver elevado ou ocorrer perda de H⁺; Acidose respiratória: ocorre aumento na pCO₂; Alcalose respiratória: ocorre redução na pCO₂³⁷.

1.3.1 Lactato

Durante o exercício físico, o equilíbrio ácido-base é perturbado temporariamente devido ao aumento da demanda energética e do metabolismo celular. Ocorre elevação na produção de lactato e acúmulo anormal de H⁺ no sangue e nas células musculares em déficit temporário de oxigênio. Os H⁺ que se acumulam no sangue, eventualmente sobrecarregam o sistema de tamponamento, conseqüentemente as trocas gasosas e a manutenção do equilíbrio ácido-base são funções imediatas que determinam se os níveis de hipóxia são toleráveis ao organismo³⁹.

Para o funcionamento normal das células é necessário suprimento contínuo de O₂ para atender as demandas energéticas do organismo. Em condições que os tecidos

são privados de O_2 ocorre produção de energia em anaerobiose, ou seja, fermentação láctica, e conseqüentemente o aumento da produção de lactato, que se acumula no sangue, a uma taxa mais rápida do que a capacidade de remoção do fígado e rins. Para que o fígado possa remover o lactato, os valores de pH devem estar em níveis normais. Caso esteja em acidose, a capacidade de remoção do lactato pode ser e severamente prejudicada. Valores de pH do sangue ≤ 7.0 , a captação de lactato é tão prejudicada que o fígado produz mais do que consome lactato³⁸.

Dados disponíveis na literatura demonstram que o fumo afeta importantes parâmetros fisiológicos, que compromete a função da hemoglobina no transporte e captação de O_2 para os tecidos, com potencial para promover hipóxia^{11,18,29,30,40}, no entanto, durante a realização do exercício físico exaustivo ocorre o aumento no consumo de O_2 para atender a demanda metabólica favorecendo o surgimento da hipoxia²¹. A instauração da hipóxia no fumante pode provocar redução do desempenho físico, com conseqüente intolerância ao exercício físico^{40,41} devido ao aumento nas concentrações sanguíneas de CO promovido pelo tabagismo^{14,29}. Diante do exposto a proposta deste estudo foi identificar os efeitos da exposição aguda a fumaça de cigarro (EFC) sobre: i) o curso temporal das alterações bioquímicas gasométricas; e ii) o desempenho físico de ratos submetidos ao teste físico de natação. A hipótese deste estudo é que a hipóxia constitui-se como um dos mecanismos da intolerância ao exercício físico.

2. OBJETIVO

Investigar se os parâmetros bioquímicos gasométricos sanguíneos e o desempenho físico de ratos são alterados pela exposição aguda a fumaça de cigarro (EFC).

2.1. Objetivos específicos

1. Investigar o curso temporal das alterações bioquímicas gasométricas, oximetria, metabolitos e o estado ácido-base, promovidas pela EFC, em ratos.
2. Avaliar se as alterações bioquímicas induzidas pela EFC se associam ao desempenho físico de ratos submetidos ao teste físico de natação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 60 ratos Wistar, pesando entre 395 a 580 gramas, provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Durante o protocolo de pesquisa, os animais foram alojados em ambiente com temperatura controlada em torno de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclos de luminosidade de 12 horas claro/escuro, água e ração (*PURINA*[®]) *ad libitum*. Todos os protocolos realizados seguiram o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 85-23, revised 1996), e teve aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo, UFES (Protocolo N^o063/2012).

3.2. Protocolo Experimental

Os ratos foram randomizados em dois grupos: não exposto à fumaça de cigarro (Controle, n=15) e exposto agudamente à fumaça de cigarro (EFC, n=45). Os animais do grupo controle foram submetidos aos protocolos: de peso corporal, adaptação ao meio líquido, avaliação de desempenho em teste físico de natação, coleta sanguínea e análise gasométrica. Os animais do grupo EFC foram submetidos aos mesmos protocolos dos animais controle, o que diferiu entre os grupos foi à intervenção, que consistiu na Exposição à Fumaça de Cigarros. Com o intuito de avaliar o curso temporal das alterações bioquímicas gasométricas e o desempenho físico em teste físico de natação promovida pela EFC nos animais, os mesmos foram subdivididos (de forma randômica) em três momentos distintos, caracterizados pelo intervalo de tempo após a EFC:

- **Momento 1** (Mo 1, n=15): realizou os protocolos para avaliação de desempenho, de coleta sanguínea e análise gasométrica, no período entre 0 a 30min após terem sido EFC;

- **Momento 2** (Mo 2, n=15): realizou os protocolos para a avaliação de desempenho, de coleta sanguínea e análise gasométrica, no período entre 31 a 60min após ter sido EFC;
- **Momento 3** (Mo 3, n=15): realizou os protocolos para a avaliação de desempenho, de coleta sanguínea e análise gasométrica, no período entre 61 a 120min após ter sido EFC.

A Figura 3 ilustra o desenho experimental proposto no presente estudo.

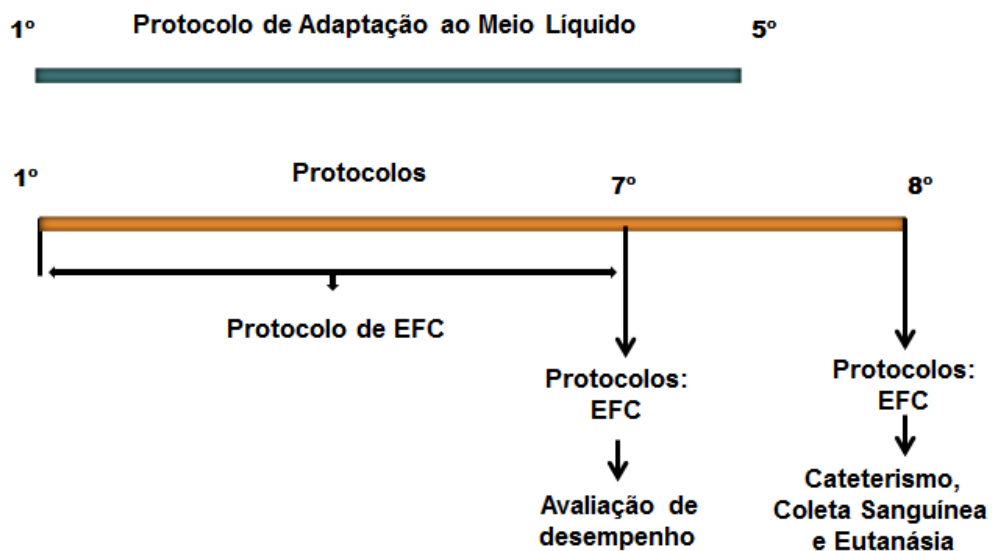


Figura 3 – Desenho experimental da pesquisa.

3.3. Peso Corporal

Os animais foram pesados antes e após a EFC em balança digital (*TOLEDO*[®]), sempre no mesmo dia e horário na semana, para acompanhamento da curva de crescimento.

3.4. Adaptação ao meio líquido

Inicialmente os animais de todos os grupos foram adaptados ao meio líquido. A adaptação ocorreu durante cinco dias ininterruptos por período diário de 6 minutos, em uma piscina com superfície lisa construída em vidro com 180 cm de comprimento, 70 cm de altura e 60 cm de largura, dividida em seis raia. Cada raia com 70 cm de altura, 60 cm de largura e 30 cm de comprimento. Somente no período de adaptação foram colocados dois ratos em cada raia, a água foi mantida a $31\pm 1^{\circ}\text{C}^{38}$. O propósito da adaptação foi reduzir o estresse do animal, sem promover adaptações fisiológicas decorrentes do treinamento físico. A Figura 4 mostra a piscina utilizada no experimento.



Figura 4 - Piscina utilizada no experimento.

No primeiro dia, os animais foram inseridos em água rasa com 7 cm de profundidade, por um período de 6 min (o tempo permaneceu o mesmo até o fim do período da adaptação). No segundo dia, o nível da água foi elevado para 22 cm de profundidade, os animais conseguiam apoiar as patas traseiras no fundo da piscina. No terceiro dia o nível da água foi elevado para 44 cm de profundidade, essa altura foi suficiente para evitar que os animais encostassem as patas e/ou a cauda no fundo da piscina. Posteriormente no quarto e quinto dias, os animais foram pesados para adequação da sobrecarga e o nível da água foi elevado para 46 cm, no quarto dia os animais nadaram suportando uma carga de 2% do peso corporal, e no quinto dia com carga de 3% do peso corporal, fixados na cauda do animal (Figura 5).

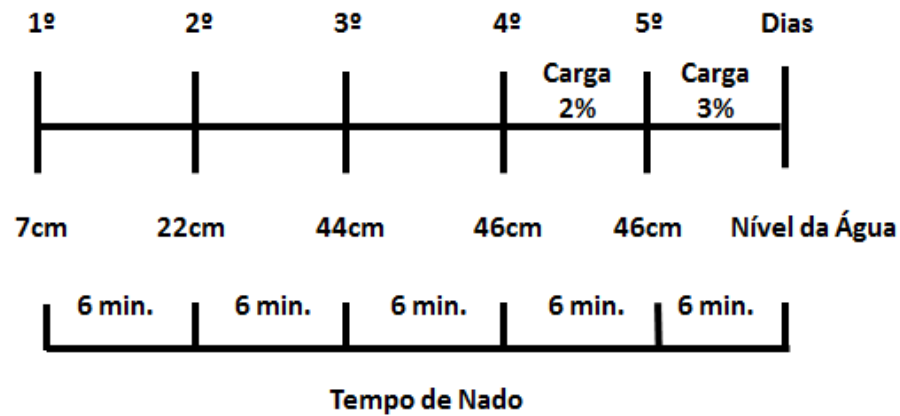


Figura 5 – Esquema do período de adaptação dos animais ao meio líquido.

3.5. Exposição aguda à fumaça de cigarro

Após o período de adaptação ao meio líquido, os animais dos grupos (Mo 1, n=15), (Mo 2, n=15) e (Mo 3, n=15), foram submetidos à EFC. O método utilizado de EFC foi descrito por Simani⁴², adaptado por Wang⁴³ e outros^{3,4,44}, que utiliza um aparato especialmente desenhado para a EFC. Conforme ilustrado na Figura 6.

Os animais eram colocados em câmaras transparentes, conectada ao aparato de fumar com dimensão de aproximadamente 90x86x60cm. Os cigarros eram acessos e a fumaça aspirada por vácuo para a câmara onde estavam às caixas dos animais, sendo no total de 20 animais por exposição, este número de animais por exposição foi mantido até o fim deste protocolo.



Figura 6 - Aparato de exposição à fumaça de cigarro.

Os animais foram submetidos à EFC no período da manhã e da tarde, durante oito dias consecutivos a uma taxa de 10 cigarros por 30 min. Ao completar os 30 primeiros minutos de EFC foi dado intervalo de descanso de 10 minutos e retornando para a câmara de exposição por mais 30 minutos de EFC, repetindo a carga tabágica de 10 cigarros, totalizando 40 cigarros ao dia que corresponde a dois maços de cigarro. Como esquematizado na Figura 7.

O cigarro utilizado para exposição foi de marca comercial. Segundo o fabricante, os componentes básicos por cigarro são: mistura de fumos, açúcares, papel de cigarros, extratos vegetais, agentes de sabor, alcatrão (10 mg), nicotina (0,8 mg), monóxido de carbono (10 mg), para cada cigarro.

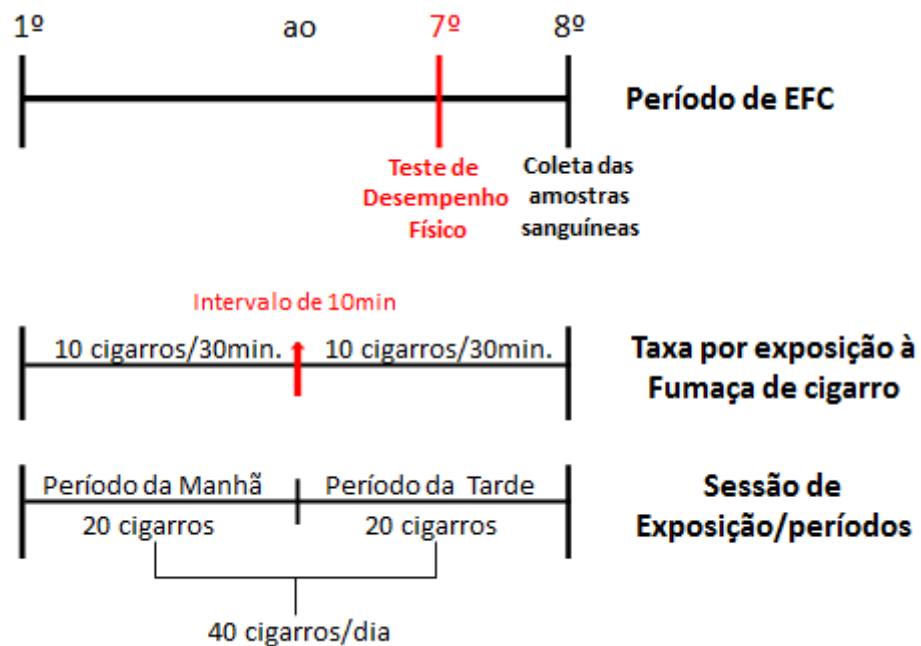


Figura 7 - Representação esquemática do período de EFC.

3.6. Avaliação de desempenho em teste físico de natação

Os animais iniciaram a avaliação de desempenho físico no sétimo dia de EFC, após finalizar a EFC do período da tarde, os animais foram encaminhados para a piscina de acordo com a formação dos grupos/momentos, ou seja, os animais EFC: Mo 1, realizou a avaliação de desempenho no período entre 0 a 30min após terem sido EFC. O grupo Mo 2, realizou a avaliação de desempenho no período entre 31 min a

60 min após terem sido EFC e por fim o grupo Mo 3, realizou a avaliação de desempenho no período entre 60min a 120min após terem sido EFC. Os animais Controle não foram EFC, apenas submetidos à avaliação de desempenho. Os animais foram colocados na piscina em raias individuais para evitar o contato entre eles, o que poderia prejudicar a avaliação.

O teste físico de natação foi realizado até a exaustão, com temperatura da água da piscina mantida em $31\pm 1^{\circ}\text{C}$, controlada por termostato e termômetro. Essa temperatura foi escolhida por ser considerada neutra para o animal⁴⁵ evitando, que o estresse térmico pudesse interferir no desempenho físico⁴⁶.

Para a avaliação de desempenho, os animais foram pesados para adequação da carga, de 4% do seu peso corporal⁴⁷, a carga foi acoplada na cauda do animal. A escolha da carga, como intensidade de esforço equivale abaixo do limiar anaeróbio de lactato para exercício de natação realizado por animais dessa linhagem^{48,49}. Desse modo é possível assegurar a característica predominantemente aeróbia do treinamento adotado.

A exaustão foi caracterizada pela incapacidade do animal em continuar a realizar o nado permanecendo por 15 segundos submersos na água⁵⁰. Quando o animal demonstrava a exaustão, era imediatamente retirado da água e, a partir da remoção do animal da água, era determinado o tempo total de nado. Este método permite avaliar de maneira consistente a tolerância dos animais ao exercício.

3.7. Coleta Sanguínea e Análise Gasométrica

No oitavo dia, posteriormente a EFC do período da tarde, os animais foram encaminhados à cirurgia de cateterismo da carótida para coleta do sangue arterial de acordo com a formação dos grupos/momentos como descrito anteriormente no protocolo de avaliação de desempenho. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura contendo Ketamina (Dopalen ® - Vetbrands) na dose de 100 miligramas (mg) por quilo de peso corporal e Xilazina (Kensol ® - König do Brasil Ltda.) na dose de 10 mg por quilo de peso. Após a confirmação de que os animais estavam anestesiados, por meio de teste de reflexo caudal, os

animais foram colocados em posição supinada em uma mesa cirúrgica tendo os membros levemente fixados. Foi realizada depilação no nível do pescoço, do lado direito do animal. Uma incisão de aproximadamente 1,5 cm foi realizada para localização e acesso ao vaso a ser cateterizado. Primeiramente, localizava-se a artéria carótida comum uma dissecação era feita para retirar todo o tecido conjuntivo ao redor do vaso, com extremo cuidado para não lesar os nervos próximos.

Após clampeamento da artéria carótida um pequeno orifício era feito com uma tesoura oftálmica, por onde era introduzido um cateter de polietileno (PE 20) previamente preenchido com solução salina e heparina (HEPARINA SODICA, ARISTON, BRASIL). Para a fixação do cateter, uma linha de algodão foi utilizada para amarrar o vaso e o cateter, impedindo que esse se movimentasse.

Posteriormente a fixação do cateter, para determinação dos parâmetros gasométricos foram obtidas amostras de 1mL de sangue arterial, de cada animal, com auxílio de um cateter de polietileno (PE 20) fixado na artéria carótida comum pelo procedimento cirúrgico de cateterismo descrito acima, conectado a uma seringa de 5mL previamente heparinizada. Após a obtenção das amostras sanguíneas as mesmas foram homogeneizadas, por um minuto, e armazenadas em recipiente resfriado, sendo imediatamente encaminhadas para análise laboratorial. As amostras sanguíneas foram processadas em analisador de gases automático Gasômetro Radiometer ABL 800 Flex (Figura 8), disponível no serviço de rotina do Laboratório de Bioquímica da Seção de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Espírito Santo.

A análise gasométrica sanguínea permitiu avaliar as seguintes variáveis:

- **Gases no Sangue:** Pressão de Dióxido de Carbono ($p\text{CO}_2$) em mmHg e pH;
- **Oximetria:** Concentração total de Hemoglobina (ctHb) em g/dL; Concentração de Hematócrito (HcT_c) em %; Saturação de Oxigênio ($s\text{O}_2$) em %; Fração de Carboxihemoglobina em relação a hemoglobina total (FCOHb) em %; Fração de Oxihemoglobina em relação a hemoglobina total ou Saturação Fracional da Hemoglobina (FO_2Hb) em %; Fração de Metemoglobina em relação a hemoglobina total (FMetHb) em %; e fração de Desoxihemoglobina em relação a hemoglobina total (FHb) em %;

- **Metabolitos:** Lactato (Lac), em mmol/L;
- **Estado Ácido-Base:** Concentração de Bicarbonato (HCO_3^-) em mmol/L; Concentração de Excesso de Base ($_{\text{c}}\text{Base}$) em mmol/L; e Concentração total de Dióxido de Carbono ($_{\text{ct}}\text{CO}_2$) em Vol%.

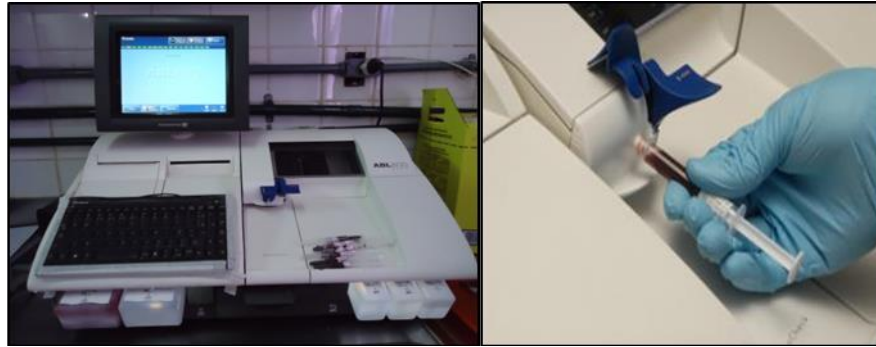


Figura 8 – Gasômetro, Radiometer ABL 800 Flex e amostra sanguínea.

3.8. Eutanásia

Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados com uma sobre dose de anestésico, pentobarbital sódico (50mg/kg intraperitoneal).

3.9. Análise Estatística

Os resultados foram expressos por medidas descritivas de posição e variabilidade. As Comparações entre os grupos (Controle, Mo 1, Mo 2 e Mo 3) com um único fator (tempo) foi realizado utilizando a técnica de análise de variância (ANOVA) para uma via, complementada com o teste de comparação múltipla de Tukey. Os resultados foram expressos como média e erro padrão.

O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a correlação entre os valores da carboxihemoglobina e o tempo de coleta da amostra sanguínea após EFC.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Para as análises estatísticas foi utilizado de pacote estatístico SigmaPlot, para

Windows versão 12.5 (Systat Software, Inc. 1735 Technology Drive, Suite 430, San Jose, CA 95110 EUA).

3.10. Limitação experimental dos métodos.

Em estudos experimentais, mesmo quando mantidas as condições laboratoriais semelhantes, não é possível assegurar homogeneidade de resposta biológica de cada animal. Nesse sentido, alguns animais submetidos ao protocolo de coleta sanguínea e análise gasométrica, apresentaram resistência à ação do anestésico, retardando o início da cirurgia e conseqüentemente a coleta sanguínea, apesar do ajuste na dose do anestésico conforme o peso corporal de cada animal. Outro fator observado foi à formação de coágulos ou bolhas de ar no interior da seringa das amostras sanguíneas, o que inviabilizou a análise pelo gasômetro, apresentando erro no resultado da amostra. Por essa razão, tornou-se necessário estabelecer um critério de exclusão da amostra. Os animais que ultrapassaram o intervalo de tempo determinado para cada momento/grupo pela resistência a ação do anestésico ou que apresentaram erro no resultado na análise gasométrica foram excluídos da amostra. Deste modo os grupos obtiveram a seguinte configuração: Controle (n=8) foram excluídos sete animais; Mo 1 (n=11) foram excluídos quatro animais, Mo 2 (n=14), foi excluído um animal e Mo 3 (n=10), foram excluídos cinco animais.

4. RESULTADOS

4.1. Peso corporal

Os dados do peso corporal (PC), dos animais mostrados na figura 9, inicialmente não apresentaram diferença estatística entre os grupos (Controle, $517,5 \pm 10,0$ g; Mo 1, $479,0 \pm 8,5$ g; Mo 2, $500,0 \pm 9,4$ g; Mo 3, $518,0 \pm 10,1$ g). Entretanto, com oito dias de EFC encontramos redução significativa no valor do peso corporal final dos animais EFC ($p=0,003$), Mo 1 ($463,3 \pm 10,9$ g) e Mo 2 ($482,8 \pm 9,2$ g), quando comparado ao controle ($524,6 \pm 12,1$ g). Para o PC dos animais Mo 3 ($499,3 \pm 9,8$ g), não houve significância quando comparado ao controle.

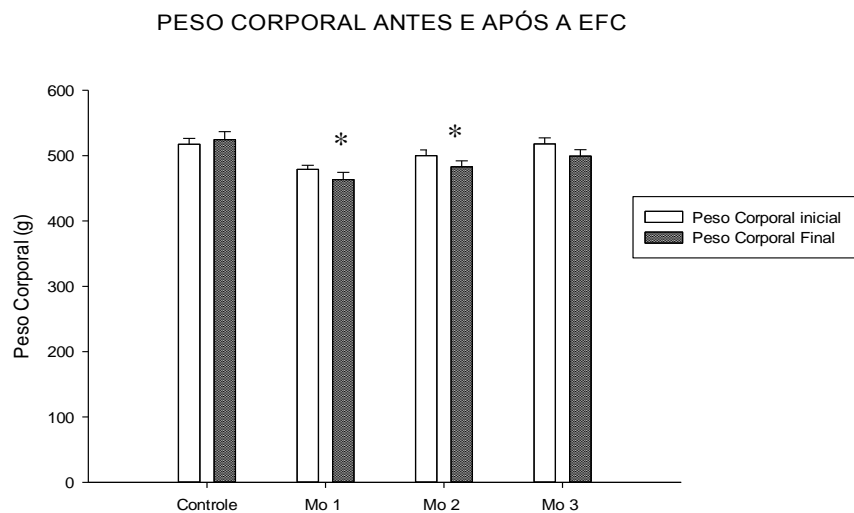


Figura 9 - Peso Corporal dos animais antes da EFC (início do protocolo) e após a EFC (na Eutanásia). Dados expressos em $\text{media} \pm \text{erro padrão}$. ANOVA de uma via, complementado pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$ Controle vs Mo 1 e Mo 2.

4.2. Avaliação de desempenho

A Figura 10 mostra o resultado da avaliação de desempenho em teste físico de natação até a exaustão dos animais EFC e Controle. Não houve diferença significativa entre os animais Controle ($C=373,0\pm 39,8s$) comparado com os animais EFC Mo 1 ($273,0\pm 15,9s$), Mo 2 ($298,5\pm 23,0s$) e Mo 3 ($318,4\pm 24,2s$).

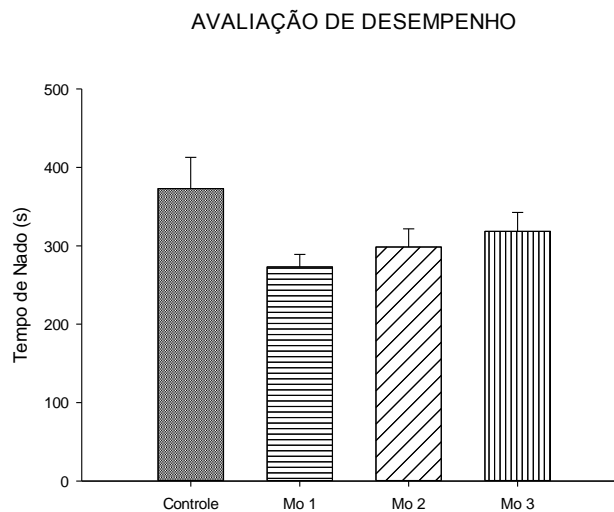


Figura 10 - Tempos de nado dos animais Controle e EFC Mo 1 (0-30min após EFC), Mo 2 (31-60min após EFC) e Mo 3 (61-120min após EFC). Dados expressos em média ± erro padrão. ANOVA de uma via, complementado pelo Teste de Tukey.

4.3. Análise de hemogasometria

4.3.1. Gases no sangue

Na Tabela 1 estão os valores da análise de gases sanguíneos de pH e de pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2). Não houve diferença significativa entre os grupos. Os valores de pressão parcial de oxigênio (pO_2) não foram obtidos através dos registros no exame.

Tabela 1 - Valores de pH e pCO₂ no sangue.

Variáveis	Grupos			
	Controle (n=8)	Mo 1 (n=11)	Mo 2 (n=14)	Mo 3 (n=10)
pH	7,30±0,00	7,30±0,01	7,31±0,00	7,30±0,01
pCO ₂ (mmHg)	57,2±1,07	60,9±2,18	58,9±1,96	58,3±3,24

Valores da análise dos gases pH e pCO₂ (mmHg) dos animais: Controle, Mo 1 (0-30min após EFC), Mo 2 (31-60min após EFC) e Mo 3 (61-120min após EFC). Dados expressos em média±erro padrão. ANOVA de uma via, complementado pelo Teste de Tukey.

4.3.2. Oximetria

A Figura 11 apresenta os valores da concentração total de hemoglobina presentes no sangue arterial dos animais Controle e EFC. Não houve diferença significativa entre os animais Controle (C=15,7±0,2g/dL) e EFC Mo 1 (14,9±0,3g/dL), Mo 2 (14,6±0,2g/dL) e Mo 3 (15,3±0,2 g/dL).

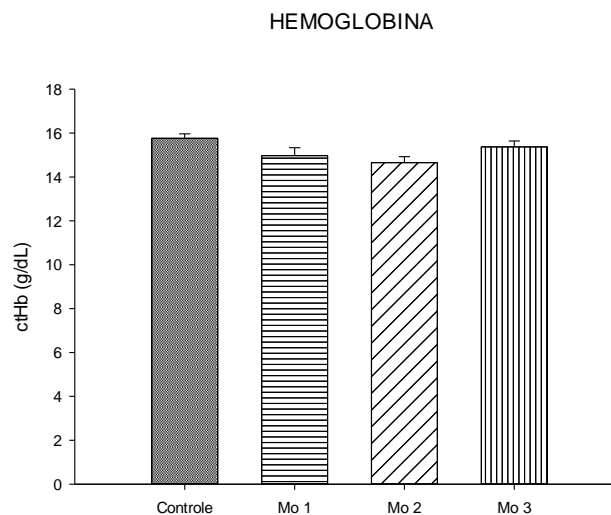


Figura 11 - Concentração total de hemoglobina (g/dL) nos animais Controle e EFC Mo 1 (0-30min após EFC), Mo 2 (31-60min após EFC) e Mo 3 (61-120min após EFC) . Dados expressos em média±erro padrão. ANOVA de uma via, complementado pelo Teste de Tukey.

A Figura 12 apresenta os valores da concentração de hematócritos presente no sangue arterial dos animais Controle e EFC. Não houve diferença significativa entre os animais Controle ($C=48,2\pm 0,6\%$) e EFC Mo 1 ($45,9\pm 1,0\%$), Mo 2 ($44,9\pm 0,8\%$) e Mo 3 ($47,0\pm 0,7\%$).

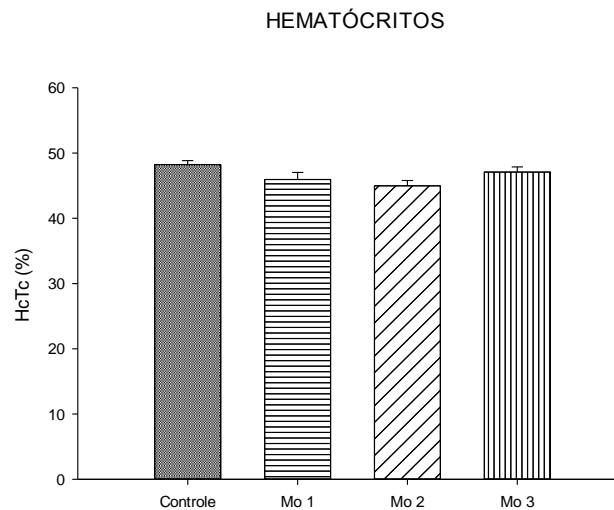


Figura 12 - Concentração de Hematócrito (g/dL) nos animais Controle e EFC Mo 1 (0-30min após EFC), Mo 2 (31-60min após EFC) e Mo 3 (61-120min após EFC). Dados expressos em $\text{media} \pm \text{erro padrão}$. ANOVA de uma via, complementado pelo Teste de Tukey.

A Figura 13 mostra os valores da Saturação de Oxigênio (sO_2), dos animais Controle e EFC. Houve diferença significativa ($p=0,003$), nos animais Mo 1 ($91,4\pm 2,0\%$) e Mo 2 ($87,1\pm 1,8\%$), os mesmos apresentaram valores maiores da sO_2 comparado com os animais Controle ($78,2\pm 1,5\%$). Os animais EFC Mo 3 ($84,5\pm 2,9\%$) não apresentaram diferença estatística quando comparado ao controle.

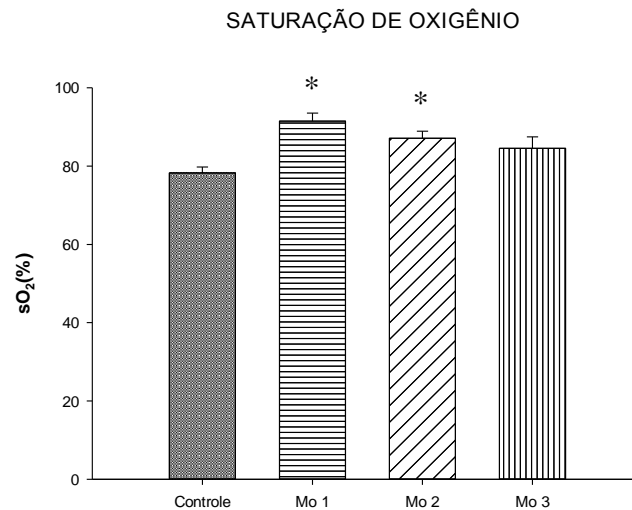


Figura 13 - Saturação de oxigênio (%), dos animais: Controle, Mo 1 (0-30min após EFC), Mo 2 (31-60min após EFC) e Mo 3 (61-120min após EFC). Dados expressos em $\text{media} \pm \text{erro padrão}$. ANOVA de uma via, complementado pelo Teste de Tukey.

* $p < 0,05$ Controle vs Mo 1 e Mo 2.

A Figura 14 mostra a porcentagem de oxihemoglobina com relação à hemoglobina total (FO_2Hb) dos animais Controle e EFC. Não houve diferença significativa entre os animais Controle ($C=78,7\pm 1,4\%$) e EFC Mo 1 ($68,3\pm 1,9\%$), Mo 2 ($77,3\pm 2,2\%$) e Mo 3 ($73,2\pm 5,8\%$).

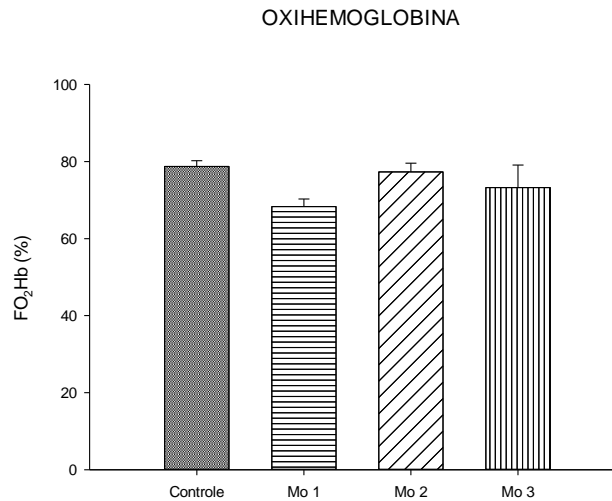


Figura 14 - Fração de Oxihemoglobina em hemoglobina total (%), nos animais: Controle, Mo 1 (0-30min após EFC), Mo 2 (31-60min após EFC) e Mo 3 (61-120min após EFC). Dados expressos em $media \pm erro$ padrão. ANOVA de uma via, complementado pelo Teste de Tukey.
* $p < 0,05$

A Figura 15 mostra os valores em porcentagem da desoxi-hemoglobina em hemoglobina total (FHHb) dos animais Controle e EFC. Os animais EFC Mo 1 ($6,33\pm 1,5\%$) e Mo 2 ($11,31\pm 1,5\%$) apresentaram redução significativa nos valores de HHb ($p=0,001$), comparado com os animais Controle ($21,90\pm 1,5\%$). Os animais EFC Mo 3 ($15,25\pm 2,4\%$) não apresentaram diferença estatística quando comparado ao controle.

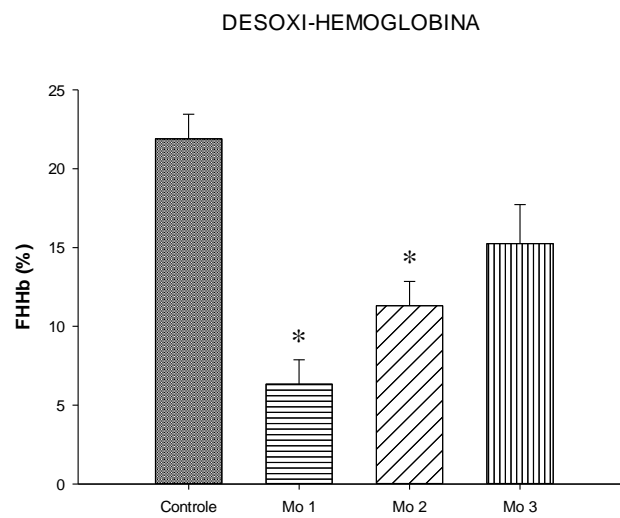


Figura 15 - Fração de desoxi-hemoglobina em hemoglobina total (%), nos animais: Controle, Mo 1 (0-30min após EFC), Mo 2 (31-60min após EFC) e Mo 3 (61-120min após EFC). Dados expressos em média \pm erro padrão. ANOVA de uma via, complementado pelo Teste de Tukey.
* $p<0,05$ Controle vs Mo 1 e Mo 2.

A Figura 16 mostra os valores da Metemoglobina em hemoglobina total (FMetHb) dos animais Controle e EFC. Os animais Mo1 ($1,9\pm 0,3\%$) apresentaram aumento significativo de MetHb ($p=0,001$), comparado com os animais Controle ($0,1\pm 0,1\%$). Os animais Mo 2 ($0,4\pm 0,1\%$) e Mo 3 ($0,3\pm 0,1\%$) não apresentaram diferença estatística quando comparado ao controle.

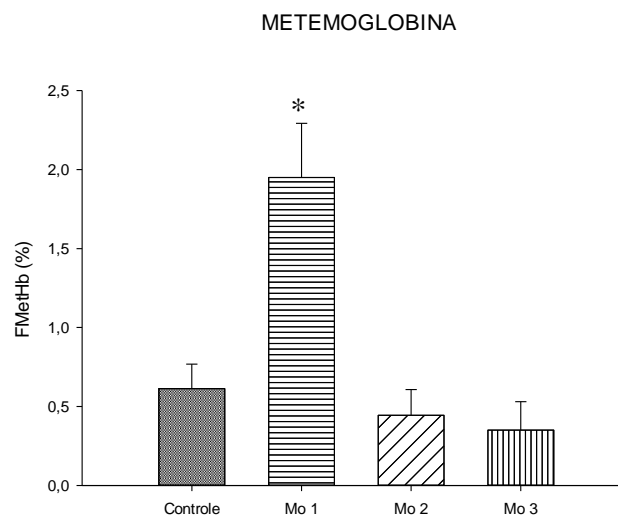


Figura 16 - Fração de metemoglobina em hemoglobina total (%), dos animais: Controle, Mo 1 (0-30min após EFC), Mo 2 (31-60min após EFC) e Mo 3 (61-120min após EFC). Dados expressos em $\text{média} \pm \text{erro padrão}$. ANOVA de uma via, complementado pelo Teste de Tukey.
* $p < 0,05$ Controle vs Mo 1

A Figura 17 mostra os valores da fração de carboxihemoglobina em hemoglobina total (FCOHb) dos animais Controle e EFC. Os animais EFC Mo 1 ($25,40 \pm 0,6\%$), Mo 2 ($13,60 \pm 0,5\%$) e Mo 3 ($8,23 \pm 0,7\%$) apresentaram aumento significativo de COHb ($p=0,001$), comparado com os animais Controle ($0,07 \pm 0,0\%$). Os animais Mo 1, Mo 2 e Mo 3 apresentaram diferenças significativas entre eles.

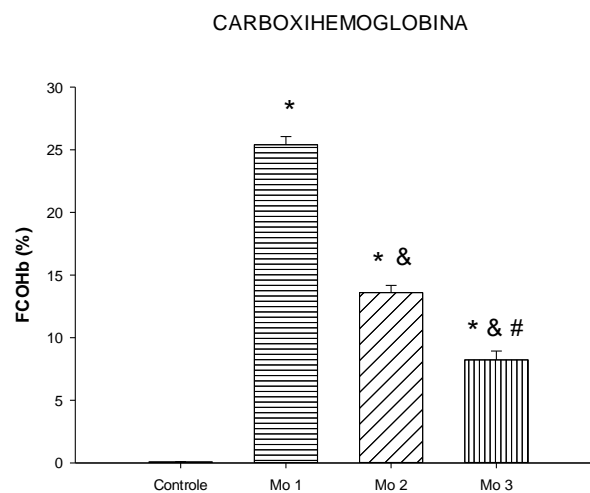


Figura 17 - Fração de carboxihemoglobina em hemoglobina total (%) dos animais: Controle, Mo 1 (0-30min após EFC), Mo 2 (31-60min após EFC) e Mo 3 (61-120min após EFC). Dados expressos em $\text{media} \pm \text{erro padrão}$. ANOVA de uma via, complementado pelo Teste de Tukey.
 * $p < 0,05$ Controle vs Mo 1, Mo 2 e Mo 3.
 & $p < 0,05$ Mo1 vs Mo 2 e Mo 3.
 # $p < 0,05$ Mo 2 vs Mo 3.

4.3.3. Metabólicos

Na Figura 18 estão os valores de Lactato dos animais Controle e EFC. Os animais Mo 1 ($2,62 \pm 0,2 \text{ mmol/L}$) apresentaram aumento significativo de Lactato ($p=0,012$) comparados com os animais Controle ($1,71 \pm 0,2 \text{ mmol/L}$). Os animais EFC Mo 2 ($1,79 \pm 0,1$) e Mo 3 ($1,54 \pm 0,0 \text{ mmol/L}$) não apresentaram diferença estatística quando comparado ao controle.

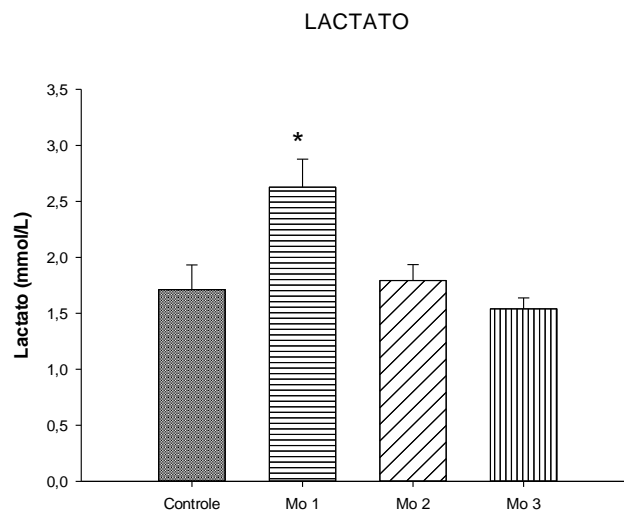


Figura 18 - Lactato (mmol/L) dos animais: Controle, Mo 1 (0-30min após EFC), Mo 2 (31-60min após EFC) e Mo 3 (61-120min após EFC). Dados expressos em $\text{media} \pm \text{erro padrão}$. ANOVA de uma via, complementado pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$ Controle vs Mo 1

4.3.4. Estado Ácido-Base

Na Tabela 2 estão os valores da análise do estado ácido-Base. Não houve diferença significativa entre os grupos para Bicarbonato (HCO_3^-), Excesso de Base (cBase) e Dióxido de Carbono (ctCO₂).

Tabela 2 - Valores de HCO_3^- , cBase e ctCO₂ no sangue.

Variáveis	Grupos			
	Controle (n=8)	Mo 1 (n=11)	Mo 2 (n=14)	Mo 3 (n=10)
HCO₃⁻ (mmol/L)	27,2±0,4	29,2±0,5	28,9±0,8	28,1±0,8
cBase (mmol/L)	1,7±0,2	3,3±0,4	3,2±0,7	2,3±0,6
ctCO₂ (Vol%)	54,2±0,7	58,9±0,8	57,9±1,5	56,0±1,7

Valores da análise do estado ácido-base de HCO_3^- (mmol/L), cBase (mmol/L), e ctCO₂ (Vol%) dos animais: Controle, Mo 1 (0-30min após EFC), Mo 2 (31-60min após EFC) e Mo 3 (61-120min após EFC). Dados expressos em média±erro padrão. ANOVA de uma via, complementado pelo Teste de Tukey.

4.4. Correlação de tempo da coleta sanguínea vs valores da COHb

A Figura 19 ilustra a correlação temporal da coleta sanguínea com a concentração de COHb (%), obtidos na análise gasométrica do sangue arterial dos animais EFC ($p=0,001$, $r=-0,886$).

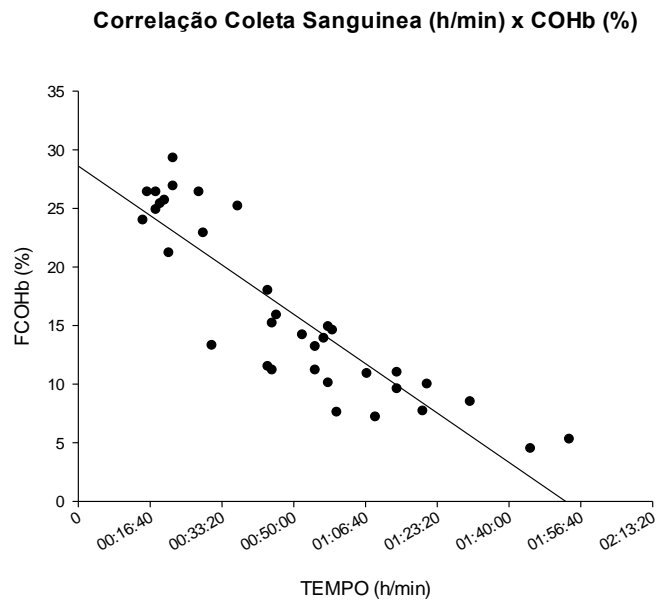


Figura 19 - Correlação da Coleta Sanguínea (h/min) e COHb (%) nos animais EFC: Mo 1 (0-30min após EFC), Mo 2 (31-60min após EFC) e Mo 3 (61-120min após EFC), da análise de correlação de Pearson.* $p<0,05$.

5. DISCUSSÃO

5.1. Peso Corporal

A EFC promoveu redução do peso corporal dos animais EFC. Dados semelhantes foram encontrados em estudos realizados com ratos wistar, submetidos à exposição crônica a fumaça de cigarro por um período de 3 meses consecutivos^{4,5}. Vale ressaltar que em nosso estudo a exposição à fumaça de cigarro foi aguda, por um período de oito dias consecutivos, e mesmo assim, a EFC resultou em diminuição do peso corporal dos animais.

Uma das possíveis explicações é a influência da nicotina, substância presente no fumo. A nicotina provoca efeito estimulante sobre o sistema nervoso simpático⁵², levando a um aumento da taxa de noradrenalina¹⁵. Estudo com animais e nicotina mostrou aumento de 10% do dispêndio energético, com elevada liberação de noradrenalina e serotonina que inibem o apetite. Por sua vez, a supressão nicotínica resulta na queda da taxa metabólica, o que explica, em parte, o aumento de peso nos ex-fumantes e também no baixo peso dos fumantes. Sugere-se ainda que a nicotina promova um incremento na capacidade de consumo energético por meio de alterações do metabolismo basal e dos gastos com o exercício físico, além disso, induz o aumento da secreção de leptina pelo adipócito. Esta proteína está relacionada com a redução do apetite e com a regulação do peso corporal⁵³.

5.2. Avaliação de desempenho

Ao avaliarmos a cinética da curva de desempenho físico da Figura 10 verificamos que não houve diferença estatística entre os animais EFC comparados com os animais Controle. No entanto, observamos que o rendimento dos animais EFC obteve queda acentuada nos valores de tempo de nado comparado com os animais Controle, o que demonstra ser biologicamente importante, pois, mesmo decorridos 120min após a EFC, os valores médios de tempos de nado permaneceram inferiores

em relação ao Controle. Sugere-se que os animais EFC apresentaram intolerância ao exercício físico, uma vez que, o menor desempenho físico pode ser devido a influência da EFC, o que acarretou em aumento das concentrações sanguíneas de lactato, carboxihemoglobina e metemoglobina, encontrados neste estudo.

O exercício físico provoca alterações fisiológicas importantes no organismo, como o aumento da atividade metabólica nos músculos esqueléticos com consequente aumento no consumo de O_2 ²¹. Contudo, fumantes apresentam incremento da concentração de monóxido de carbono na corrente sanguínea^{14,29}, restringindo a quantidade de oxigênio transportado para os capilares musculares, o que afeta de forma adversa o desempenho do músculo esquelético. A redução no transporte de O_2 pode limitar a potência aeróbia^{40,41}. Desse modo, fumantes que realizam exercício físico sofrem mudanças metabólicas induzidas pelo tabagismo que contribuem para intolerância ao exercício¹¹.

Pesquisas realizadas em humanos encontraram redução no desempenho físico em fumantes com aumento da fadiga e elevação na concentração sanguínea de COHb e lactato, em contradição, os achados encontrados neste estudo em modelo experimental, sugere que EFC não prejudicou o desempenho físico de ratos submetidos ao teste físico de exaustão em natação, apesar de haver uma redução no tempo de nado dos animais demonstrando se biologicamente importante, porém vale ressaltar que observamos aumento nas concentrações sanguíneas dos parâmetros bioquímicos gasométricos de COHb, lactato e MetHb, resultados estes similares com a presente pesquisa^{11,54}.

Estudos realizados em humanos avaliaram a influência do tabagismo em indivíduos fumantes e não-fumantes, por meio de teste de corrida intermitente, no grupo fumante houve maior índice de fadiga durante o exercício, em comparação com o grupo de não-fumantes. Além deste fato, o consumo máximo de oxigênio dos participantes do grupo fumante durante o exercício aeróbio foi menor do que o grupo não-fumantes⁵⁴. A redução no consumo máximo de O_2 e da capacidade aeróbia em fumantes está associada à ineficiência no transporte de oxigênio, uma vez que, o fumo induz ao aumento no conteúdo sanguíneo de CO, formando a carboxihemoglobina responsável por reduzir o aporte de O_2 aos tecidos dos músculos ativos^{22,23,40}. Outro estudo mostrou que os fumantes eram

significativamente incapazes de lidar com a fadiga, em comparação com não-fumantes⁵⁵. O aumento da fadiga nos fumantes pode estar relacionado à baixa aptidão cardiorrespiratória, visto que, o fornecimento de oxigênio através dos capilares nos músculos ativos encontra-se reduzidos em fumantes, o que diminui a capacidade dos músculos esqueléticos para suportar a fadiga⁵⁶.

Com base na literatura, o exercício físico é um processo fisiológico que perturba o equilíbrio ácido-base temporariamente e, aumenta a demanda energética e, o metabolismo celular tecidual do músculo esquelético³⁹. Estudo realizado com indivíduos tabagistas e submetido à atividade física submáxima aponta que os fumantes apresentam alta conversão de lactato em glicose durante o exercício, em comparação com os não-tabagistas⁶². O aumento nessa taxa de conversão em fumantes reduz o estoque de carboidratos no corpo, gerando fadiga muscular precoce e, conseqüentemente, a ausência de carboidrato disponível, leva à redução da velocidade da absorção de glicólise, diminuindo a concentração de ácido pirúvico, o que reduz a taxa de produção aeróbia de ATP pela restrição da quantidade dos compostos (intermediários) do ciclo de Krebs⁶⁷.

Os efeitos agudos do fumo e da inalação de CO durante o exercício máximo foram observados em um estudo, realizado com 16 homens jovens saudáveis, classificados como fumantes leves (de 5 a 25 cigarros por dia), que realizaram um teste de esforço máximo em ciclo ergômetro. Os resultados mostraram redução no consumo máximo de oxigênio, apontando o aumento na concentração sanguínea de CO como um dos principais fatores responsáveis pela redução de desempenho de exercício máximo⁴¹. Pesquisa realizada em humanos apresentaram concentrações sanguíneas elevadas de COHb (10%), associado a redução no desempenho em exercício realizado até a exaustão. A redução no tempo de trabalho até a exaustão foi atribuída a um decréscimo na liberação de O₂ para os tecidos musculares metabolicamente ativo, como resultado do aumento da concentração sanguínea arterial de COHb⁵⁷. Estudos apontam que concentrações sanguíneas elevadas de CO em fumantes, favorecem a formação da COHb, visto que, esse gás possui maior afinidade pela Hb que o O₂. A formação da COHb compromete o transporte de O₂, uma vez que, este fenômeno muda a conformação da Hb para a forma relaxada, fazendo com que o O₂ ligue-se fortemente aos outros sítios restantes da Hb, impedindo a liberação do O₂ aos tecidos e deslocando a curva de dissociação da Hb

para a esquerda¹⁵. Esse processo retarda a liberação de O₂ nos tecidos promovendo a fadiga precoce¹¹.

Elevações na concentração sanguínea de metemoglobina pode também prejudicar a liberação de oxigênio para os tecidos, promovendo hipóxia tecidual e assim refletindo no desempenho físico³³.

5.3. Análise Gasométrica

Por meio de testes de gasometria arterial, pode-se determinar as concentrações de oxigênio e de dióxido de carbono, assim como a acidez do sangue, que não são mensurados em uma amostra de sangue venoso. Esse teste permite avaliar doenças que comprometam as trocas gasosas ou o equilíbrio entre oferta e consumo de oxigênio aos tecidos⁵¹. Desta forma, com resultados obtidos no presente estudo podemos realizar as seguintes discussões.

Em nosso estudo não encontramos diferença entre os grupos Controle, Mo 1, Mo 2 e Mo 3, nos valores de gases sanguíneos (pH e pCO₂) e no estado ácido-base (cBase, ctCO₂ e HCO₃⁻). Durante o exercício ocorre aumento da atividade metabólica muscular, acarretando em aumento do fluxo de O₂ para os tecidos musculares e a concomitante remoção de CO₂⁵⁸. Pesquisa realizada em ratos da linhagem wistar, submetidos ao treinamento físico aeróbio crônico e avaliados por meio de protocolo de teste de esforço em esteira, não foi observado diferença estatística nos valores hemogasométricos de pH, pCO₂ e HCO₃⁻, quando comparado aos grupos de animais treinados e sedentários⁵⁹, esses achados corroboram com os resultados obtidos neste estudo, embora o modelo experimental utilizado tenha sido o mesmo proposto em nosso estudo, o protocolo de avaliação de desempenho diferiu assim como o modelo de agressão utilizado nesta pesquisa.

Os valores das concentrações sanguíneas de Hb e de HcTc não apresentaram diferença entre os grupos. Uma possível explicação é que a exposição à fumaça de cigarro foi realizada de forma aguda, ou seja, por um período curto de apenas oito dias consecutivos. Se levarmos em consideração que o tempo médio de vida de um glóbulo vermelho (eritrócitos) é de cerca 120 dias, a medida da quantidade de

hemoglobina presente dentro dos glóbulos vermelhos, pode fornecer uma avaliação no período de 60 a 90 dias que antecedem a coleta de sangue para o exame. É de se esperar, portanto que, o valor da concentração sanguínea de hemoglobina e eritrócitos encontrados nos exames do presente estudo, reflete as concentrações de 60 a 90 dias anteriores ao teste, por este motivo o período de oito dias de exposição torna-se pouco representativo se levarmos em conta a sobre vida da hemoglobina.

O conjunto de dados de saturação de O_2 aumentada, de desoxi-hemoglobina reduzida e a não alteração da concentração sanguínea de oxihemoglobina, indica que a EFC prejudicou a liberação de O_2 para os músculos. Mesmo com valores não significativos para a avaliação de desempenho físico, as alterações provocadas pela EFC referente à saturação de O_2 e desoxi-hemoglobina, sugere-se que possivelmente durante a realização de exercício físico pode ocorrer fadiga precoce com intolerância ao exercício²⁷. Uma vez que, o aumento da saturação O_2 e a redução da desoxi-hemoglobina indica que o papel de transporte da Hb encontra-se ineficiente, por ter redução na concentração de desoxi-hemoglobina, o que indica que a Hb encontra-se reduzida com baixa atividade transportadora de O_2 para os tecidos.

Outro fator deve-se ao aumento da saturação de O_2 , níveis elevados na concentração sanguínea de CO promovida pela EFC, favorecendo a formação de COHb, uma vez que, o CO possui maior afinidade pela Hb do que o O_2 . A formação de COHb é bastante estável e dificulta o transporte e liberação de oxigênio, pois o CO ocupa o lugar do O_2 nos sítios de ativação da Hb, promovendo o aumento na saturação da Hb por CO. Além disso, a ligação do CO em um dos quatro sítios da heme faz com que os outros sítios restantes liguem-se fortemente ao O_2 , impedindo a liberação do O_2 aos tecidos, deslocando a curva de dissociação da Hb para a esquerda, reduzido a atividade transportadora da Hb.

Os resultados mostraram elevação significativa nas concentrações de MetHb, COHb e lactato sanguíneo nos animais EFC em relação aos animais Controle. Estes dados estão relacionados com prejuízo em realizar a captação e o transporte de O_2 .

Para a concentração da COHb, os animais EFC apresentaram diferença estatística em todos os grupos (Mo 1, 2 e 3) se comparado aos animais Controle. Esse aumento aponta que os ratos do grupo fumante realmente foram EFC. Essa

resposta dos grupos EFC indica que a exposição à fumaça de cigarro apresenta elevada concentração de CO que possui alta afinidade pela Hb, formando o composto COHb. A formação de COHb é bastante estável e dificulta o transporte e liberação de oxigênio aos diversos tecidos, podendo causar hipóxia tecidual¹⁴.

A MetHb apresentou aumento significativo no grupo Mo 1 (0-30min após EFC), comparado com o grupo Controle. Isto indica prejuízo no metabolismo oxidativo, pois a oxidação do ferro (do ferroso para o estado férrico) na porção heme da Hb, mostra que não ocorreu à ligação do O₂ provocando assim, redução da capacidade do transporte de O₂ aos tecidos^{31,32,33}. Outro efeito da oxidação do ferro é o aumento da afinidade do O₂ nos locais remanescentes da heme que não foram oxidados, a consequência é a diminuição na liberação de O₂ tecidual³². Ao comparar os grupos Mo 2 e Mo 3 com o grupo Controle observamos que não houve diferença estatística, indicando que com o passar do tempo, o efeito da EFC diminuiu a ação sobre a formação da MetHb.

Os valores da concentração sanguínea de lactato (mmol/L) aumentou significativamente em relação ao Mo 1 se comparado com os valores obtidos nos animais Controle. Podemos observar que os grupos Mo 2 e Mo 3 quando relacionados com o grupo Controle não apresentaram diferença estatística, uma vez que, a produção normal de lactato é de 1mmol/Kg/hora, essa produção ocorre principalmente nos músculos esqueléticos, intestino, cérebro e glóbulos vermelhos (Kellum). Em condições normais de oxigenação, nas células musculares a glicose é convertida em piruvato, produto final da glicólise, que passa a ser metabolizado em dióxido de carbono e água na mitocôndria e em condições anaeróbia o piruvato é convertido em lactato e acumulando na corrente sanguínea. Possivelmente os achados deste trabalho referente ao lactato estejam relacionados com o tempo após a EFC, permitindo aumento da concentração de lactato no Mo1 (via anaeróbia) e com a disponibilidade de O₂ para os tecidos, de tal forma que reduziu a concentração sanguínea de lactato nos grupos Mo 2 e Mo 3 (via aeróbia).

Pesquisa realizada em ratos correndo em esteira com intensidade crescente demonstrou que a concentração de lactato sanguíneo apresenta um padrão similar aos descrito em humanos⁶¹. Estudo realizado em fumantes encontrou concentração elevada de Lactato durante o exercício e um maior taxa de conversão de glicose em

lactato se comparado com não fumantes, o que pode indicar um aumento na dependência da glicose⁶². Exercícios de alta intensidade realizados entre 65% a 85% do consumo máximo de oxigênio resultam em acúmulo de ácido láctico nas células musculares, uma vez que, as células mantêm como fonte energética a adenosina trifosfato (ATP) para a contração muscular por meio do metabolismo anaeróbico de glicose⁶³. Esses estudos corroboram com os resultados obtidos nesta pesquisa, visto que, encontramos concentração aumentada de lactato sanguíneo em ratos submetidos ao teste físico de exaustão em natação com carga de 4% do peso corporal.

5.4. Correlação de tempos de coleta sanguínea versus COHb

A correlação de *Person* demonstrou que os níveis sanguíneos da concentração de COHb possui uma relação de tempo dependência com o tempo de coleta sanguínea, os animais EFC apresentam associação negativa significativa ($p=0,001$, $r=-0,886$) entre maior valor de COHb (%) com menor tempo de coleta sanguínea. Ou seja, quanto mais o tempo se afasta do período de EFC, temos redução na concentração sanguínea de COHb. Mesmo após ter decorrido 120 min da realização da EFC os níveis de COHb ainda se encontram elevados se comparado com os animais Controle.

A quantidade de CO absorvido no organismo, depende da concentração de CO presente no ambiente, da ventilação alveolar, da duração a exposição e do débito cardíaco⁶⁴. O CO somente é eliminado da circulação através da respiração¹³. Estudo realizado em ovelhas, encontraram elevação na concentração sanguínea de COHb, após receber misturas de gases de CO, por meio de insuflação, a concentração de COHb foi reduzindo progressivamente após a exposição ao CO⁶⁵. Apesar de o modelo experimental proposto ser diferente da nossa pesquisa, podemos observar que a dinâmica do processo de eliminação de CO em ambos os estudos, obtiveram respostas semelhantes. Sendo assim, nossa pesquisa aponta que as agressões provocadas pela EFC ainda permanecem instaurada mesmo após ter decorrido 120 min da EFC, devido ao aumento da concentração sanguínea de COHb.

6. CONCLUSÃO

Diante de todos os resultados encontrados neste estudo e confrontando com os estudos disponíveis na literatura, podemos concluir que:

- A exposição aguda à fumaça de cigarro provoca alterações em parâmetros bioquímicos gasométricos e prejudica o transporte de oxigênio. Promove aumento nas concentrações sanguíneas de Carboxihemoglobina, Lactato, Metahemoglobina, Saturação de Oxigênio, e redução na concentração sanguínea de desoxi-hemoglobina.
- No modelo de exposição aguda à fumaça de cigarro proposto neste trabalho, não encontramos prejuízo no desempenho físico dos ratos EFC submetidos ao teste físico de exaustão em natação.

7. REFERÊNCIAS

1. Caetano, D. Classificação Internacional de Doenças - CID-OMS 10ª CID F.17.2 (Tradução) Edições Artes Médicas. Porto Alegre, 1993.
2. Wong LS, Green HM, Feugate JE, Yada VM, Nothnagel EA, Martins-Green M. Effects of "second-hand" smoke on structure and function of fibroblasts, cells that are critical for tissue repair and remodeling. *BMC Cell Biology*. 2004;5:1-14.
3. Zornoff LA, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo OS, Camapanha AO. A exposição à fumaça de cigarro intensifica a remodelação ventricular após o infarto agudo do miocárdio. *Arq Bras Cardiol*. 2006;86:276-82.
4. Castardeli E. Chronic cigarette smoke exposure results in cardiac remodeling and impaired ventricular function in rats. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2005;84:320-4.
5. Sant'ana PG. Influência do treinamento físico na disfunção ventricular direita de ratos expostos cronicamente à fumaça de cigarro. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. 2012.
6. WHO. Report on the global tobacco epidemic, 2013: enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship. World Health Organization; 2013.
7. WHO. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: World Health Organization; 2009.
8. U.S. Department of Health and Human Services. The health benefits of smoking cessation: a report of the Surgeon General. Rockville (MD): Centers for Disease Control and Prevention (US); 1990.
9. BRASIL, Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle do Tabagismo. 2013. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2013/04/controle-ao-tabagismo-sera-ampliado-na-rede-publica-de-saude>>. Acesso em: 10/12/2013.
10. Corrêa PCRP, Barreto SM, Passos VMA. Smoking-attributable mortality and years of potential life lost in 16 Brazilian capitals, 2003: a prevalence-based study. *BMC Public Health*. 2009;9:206.
11. Smith JC, Fischer HT. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Resist Atherosclerosis*. 2001;158:257-256.
12. Glantz SA, Parmley WW. Passive Smoking and Heart Disease: Mechanisms and Risk. *Journal American Medical Association*. 1995;273(13):1047-53.

13. Barrett L, Danel V, Faure J. Carbon monoxide poisoning, a diagnosis frequently overlooked. *Toxicol Clin Toxicol*. 1985;23(4-6):309-13.
14. Aronow, WS, Dendinger J, Rokaw SN. Heart rate and carbon monoxide level after smoking high, low non nicotine cigarette. *Pakistan Institute of Medical Sciences*. 1971;74:697-702.
15. Beckers S, Camu F. The anaesthetic risk of tobacco smoking. *Acta Anaesthesiol Belg*. 1991;42:45-56.
16. Baruzzi CA. Função do ventrículo direito *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 1976;47(6):435-442.
17. Makoff DL. Acid-base metabolism. In: *Clinical Disorders of Fluid and Electrolyte Metabolism*. Eds. MH. Maxwell e CR. Kleeman. McGraw-Hill Book CO. 1972;8:297.
18. Marques PA. et al. Consenso sobre o tratamento da dependência de nicotina. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2001;23(4):200-14.
19. Taylor P. Agentes que Atuam na Junção Neuromuscular e nos Gânglios Autônomos, em: *Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro. McGraw Hill. 1996;9:131-145.
20. Rosemberg J. *Pandemia do Tabagismo: Enfoques Históricos e Atuais*. São Paulo, Secretaria Estadual de Saúde, 2002.
21. Nielsen HB. Arterial desaturation during exercise in MAM: implication for O₂ uptake and work capacity. *Scand J Med Sci Sport*. 2003;13:339-358.
22. Fukuba Y, Takamoto N, Kushima K, Ohtaki M, Kihara H, Tanaka T, et al. Cigarette smoking and physical fitness. *Ann Physiol Anthropol*. 1993;12:195-212.
23. Benaards CM, Twisk JWR, Mechelen WY, Snel J, Kemper HCG. A longitudinal study on smoking in relationship to fitness and heart rate response. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35:793-800.
24. Ranney HM, Sharma V. Structure and function of Hemoglobin. In Beutler E, Lichtman M *et al* (eds) *William's Hematology*. McGraw Hill, 2000;6:345-53.
25. Forget BG. Molecular genetics of the human globin genes. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. *Disorders of hemoglobin - genetics, pathophysiology and clinical management*. Cambridge: Cambridge University Press. 2001:117-130.
26. Mcardle WD, Katch FL, Katch VL. *Fisiologia do exercício energia, nutrição e desempenho humano*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008;6.

27. Champe, PC, Harvey, RA, Ferrier, DR. *Bioquímica ilustrada*. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
28. Baraka AS, Ayoub CM, Kaddoum RN. et al. Severe oxyhemoglobin desaturation during induction of anesthesia in a patient with congenital methemoglobinemia. *Anesthesiology*. 2001;95:296-97.
29. Malcon MC, Menezes AMB, Chatkin M. Prevalence and risk factors for smoking among adolescents. *Rev. Saúde Pública*. 2003;37(1):1-7.
30. Holland, R. A. B. Rate at which CO replaces O₂ from O₂Hb in red cells of different species. *Respir Physiol*. 1969; 7: 43-63.
31. Price D. Methemoglobinemia .In: Goldfrank Toxicological emergencies. New York: McGraw Hill. 2002;6:1438-39.
32. Querido R, Roughton F. O efeito de metahemoglobina no equilíbrio entre o oxigênio e hemoglobina. *Am J Physiol* 137: 56-58, 1942.
33. Haymond S, Cariappa R, Eby CS. et al. Laboratory assessment of oxygenation in methemoglobinemia. *Clin Chem*. 2005;51:434-444.
34. Mansouri A, Luire A. Consicereview: methemoglobinemia. *Am J Hematol*. 1993;42:7-12.
35. Evora PRB, Reis CL, Ferez MA, Conte DA, Garcia LV. Distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico e do equilíbrio ácido-básico – uma revisão prática. *Medicina, Ribeirão Preto*. 1999;32:451-469.
36. Brewer E. Disorders of Acid-Base Balance. In: Arnold WC, Kallen RJ, editors. *Pediatr Clin North Am*. 1990; 37(2):429-47.
37. Rose BD, Rennke HG. Acid-base physiology and metabolic alkalosis. In: *Renal Pathophysiology. The Essentials*, Williams & Wilkins. 123-151.
38. Lloyd MH, Iles RA, Simpson BR, Strunin JM, Layton JM, Cohen RD. The effect of simulated metabolic acidosis on intracellular pH and lactate metabolism in the isolated perfused rat liver. *Clin Sci Mol Med*. 1973;45(4):543-9.
39. Roach RC. Cardiovascular regulation during hypoxia. In: *Exercise and Circulation in Health and Disease*. Saltin B, Boushel R, Secher N, Mitchell J, eds. Champaign, Ill.: Human Kinetics. 2000: 177-94.
40. McDonough P, Moffatt RJ. Smoking-induced elevations in blood carboxyhaemoglobin levels. Effect on maximal oxygen uptake. *Sports Med*. 1999;27(5):275-83.

41. Klausen K, Andersen C; Nandrup S. Acute effects of cigarette smoking and inhalation of carbon monoxide during maximal exercise. *Eur J Appl Physiol.* 1983;51:371-9.
42. Simani AS, Inoue S, Hoggs JC. Penetration of the respiratory epithelium of guinea pigs following exposure to cigarette smoke. *Lab Invest.* 1974;31:75-81.
43. Wang XD, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russel RM. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given β -carotene supplements and exposure to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst.* 1999;1:60-6.
44. Paiva SA, Novo R, Matsubara BB, Matsubara LS, Azevedo PS, Minicucci MF, Campana AO, Zornoff LA. β -carotene attenuates the paradoxical effects of tobacco smoke on the mortality of rats after experimental myocardial infarction. *J Nutr.* 2005;135(9):2109-13.
45. Harri M, Kuusela P. Is swimming exercise or cold expose for rats? *Acta Physiological Scandinavia.* Stockholm. 1986;126:189-197.
46. Fehrenback E, Niess AM. Role of Heat Shock Proteins in the exercise response. *Rev Exec Immunol.* 1999;5:57-77.
47. Vendetti P, Di Meo, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1996;331:63-68.
48. Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Luciano E, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp. Biochem. Physiol. Part A, Elmsford.* 2001;130:20-27.
49. Manchado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, Mello MAR. Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. *Rev. Bras. Med. Esporte, São Paulo.* 2006;12(5):259-262.
50. Dawson CA, Horvarth SM. Swimming in small laboratory animals. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 1970;2:51-78.
51. Piras CA. Gasometria Arterial na Relação Tempo entre Coleta e Realização do Exame. *RBTI - Revista Brasileira Terapia Intensiva.* 2002;14(3):95-98.
52. Colberg SR, Casazza GA, Horning MA, Brooks GA. Increased dependence on blood glucose in smokers during rest and sustained exercise. *J Appl Physiol (1985).* 1994;76(1):26-32.
53. Nerín I, Beamonte A, Gargallo P, Jiménez-Muro A, Marqueta A. Weight Gain and Anxiety Levels in Recent Ex-Smokers. *Arch Bronconeumol.* 2007;43:9-15.

54. Lee CL, Chang WD. The effects of cigarette smoking on aerobic and anaerobic capacity and heart rate variability among female university students. *Int J Womens Health*. 2013;17(5):667-79.
55. Morse CI, Wüst RC, Jones DA, Haan A, Degens H. Muscle fatigue resistance during stimulated contractions is reduced in young male smokers. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007;191(2):123–129.
56. King CE, Dodd SL, Cain SM. O₂ delivery to contracting muscle during hypoxic or CO hypoxia. *J Appl Physiol*. 1987;63(2):726–732.
57. Horvath SM, Raven PB, Dahms TE, et al. Maximal aerobic capacity at different levels of carboxyhemoglobin. *J Appl Physiol*. 1975;38(2):300-3.
58. Hodgson DR, Rose RJ. Evaluation of performance potential. In: *The athletic horse*. Philadelphia: W. B. Saunders. 1994;231-243.
59. Abrahão LMB. Efeitos da atividade física aeróbia no complexo vascular-alveolar no pulmão de ratos. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo (USP), 2010.
60. Andreollo A, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? Artigo de Revisão. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2012;25(1):49-51.
61. Pilis W, Zarzeczny R, Langfort J, Kaciuba-Usieko, H, Nazar K, Wojtyna J. Anaerobic threshold in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1993;171:285-289.
62. Huie MJ, Casazza GA, Horning MA, Brooks GA. Smoking increases conversion of lactate to glucose during submaximal exercise. *J Appl Physiol*. 1996;80(5):1554–1559.
63. Evans DL. Training and fitness in athletic horses. Sidney: Rirdc. 2000;87.
64. Roughron F, Darling R. The effect of carbon monoxide on the dissociation curve of oxyhemoglobin. *Am J Physiol*. 1944;141(1):17-31.
65. Shimazu T, Ikeuchi H, Sugimoto H, Goodwin CW, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr. Half-life of blood carboxyhemoglobin after short-term and long-term exposure to carbon monoxide. *J Trauma*. 2000 Jul;49(1):126-31.
66. Dube M, Green C R. Methods of collection of smoke for analytical purposes. *Recent Adv Tobacco Sci* 1982; 8: 42-102.
67. PERKINS, K. A. Metabolic effect of cigarette smoking. *Journal of Applied Physiology*. 1992;72:401-409.

