

# É possível validar estatisticamente um dispositivo experimental com 10 ratos, de baixo custo, para pesquisa em tabagismo passivo?

*Is statistical validation of an effective, low-cost experimental smoke-exposure device to study passive smoking possible with 10 rats?*

JEFFERSON BRAGA SILVA<sup>1</sup>

ANAJARA GAZZALLE<sup>2</sup>

LUCAS FERNANDO MATTOS

MANO<sup>3</sup>

FERNANDA COCOLICHIO<sup>4</sup>

JULIANA TONIETTO ZAMPIERI<sup>4</sup>

ALICE CARDOSO PELLIZZARI<sup>4</sup>

## RESUMO

**Introdução:** Pessoas não tabagistas que convivem com a fumaça produzida por fumantes podem sofrer os danos causados por esta exposição. Diversos estudos experimentais demonstraram os efeitos negativos do tabagismo, tanto ativo quanto passivo. A fim de simular a exposição passiva à fumaça do cigarro em ratos, foi desenvolvido e validado um aparato (Braga-Gazzalle) simples, barato e de fácil manutenção no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica - PUCRS. **Método:** O sistema de inalação consiste em uma caixa de polipropileno de 40x33x17 cm, dividida em dois compartimentos por uma tela de metal: o maior para ratos e o menor para cigarros. Um ventilador gera um fluxo interno contínuo de ar para que a fumaça produzida pela ponta acesa alcance os animais. Após aprovação no Comitê de Ética, 5 ratos (Grupo A) foram expostos durante 2 horas diárias à fumaça, comparado ao grupo controle de 5 ratos (Grupo B). Após exposição de 4 semanas, dosou-se a carboxihemoglobina (CoHb) sérica. Os animais foram então sacrificados. A análise estatística utilizada foi o teste t-Student, com 5% de significância. **Resultados:** No Grupo A, a média dos percentuais de CoHb sérica foi de  $11,52 \pm 4,40\%$ , enquanto no Grupo B a média encontrada foi de  $0,3 \pm 0,2\%$ . Os níveis de carboxihemoglobina observados no Grupo A foram muito maiores do que no Grupo B ( $p < 0,001$ ). **Conclusões:** O modelo experimental desenvolvido pelos autores provou que expõe adequadamente os animais à fumaça passiva. O aparato se mostrou confiável, de fácil manutenção e, sobretudo, de baixo custo operacional.

**Descritores:** Poluição por Fumaça de Tabaco. Tabagismo. Carboxihemoglobina. Modelos Animais. Ratos.

## ABSTRACT

**Background:** Nonsmokers are harmed by the exposure to the smoke produced by smokers. Several experimental studies have demonstrated the negative effects of both active and passive smoking. To simulate passive exposure to cigarette smoke in rats, a simple, inexpensive and easy-to-maintain apparatus (Braga-Gazzalle) that uses sidestream smoke was developed in the Laboratory of Surgical Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). **Methods:** The inhalation system consists of a 40x33x17 cm polypropylene box divided into 2 chambers by a perforated metal screen, the larger was used for rats and the lowest for cigarettes. A fan generates continuous internal airflow so that the smoke produced by the smoldering end of the cigarette reaches the animals. After approval by the Ethical Committee, 5 rats (Group A) was exposed daily to the inhalation of smoke during 2 hours, compared with control group with 5 rats (Group B). After four weeks of exposition, carboxyhemoglobin (CoHb) was dosed. The animals were then sacrificed. The statistical analysis used was the t-Student test with 5% significance. **Results:** In Group A, mean CoHb levels was  $11.52 \pm 4.40\%$ , and in Group B was  $0.3 \pm 0.2\%$ . Carboxyhemoglobin levels observed in Group A were much greater than in the Group B ( $p < 0.001$ ). **Conclusions:** The experimental model developed by the authors proved that properly exposes the animals to sidestream smoke. The apparatus has shown reliable easy to maintain and, above all, low operating cost.

**Keywords:** Tobacco Smoke Pollution. Smoking. Carboxyhemoglobin. Models, Animal. Rats.

Trabalho realizado no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

Artigo submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBCP.

Artigo recebido: 18/3/2011

Artigo aceito: 30/5/2011

1. Livre-Docente, Cirurgia da Mão; Ex-Presidente da Sociedade Brasileira de Microcirurgia Reconstructiva; Ex-Presidente da Sociedade Brasileira de Cirurgia da Mão; Professor Titular do Departamento de Cirurgia Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.
2. Médico Residente do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.
3. Estagiário, Acadêmico da Faculdade de Biologia da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.
4. Acadêmica da Faculdade de Medicina da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

## INTRODUÇÃO

O hábito tabagista é fator de risco para diversas doenças e seu uso é infelizmente comum nos mais variados ambientes. Pessoas não tabagistas que convivem com a fumaça produzida por fumantes sofrem os danos causados por esta exposição.

A fumaça indireta pode ser proveniente da ponta acesa (jato paralelo) ou exalada pela pessoa tabagista (jato principal). O jato paralelo contém muito mais volume e materiais tóxicos e mesmo com exposições limitadas é nocivo, com potenciais efeitos adversos<sup>1</sup>. Estudos experimentais utilizando ambas as vias evidenciaram efeitos negativos na função macro e micro-vascular em roedores expostos à fumaça do cigarro, resultando em necrose dos retalhos cutâneos, principalmente em ratos expostos no pré e no pós-operatório<sup>2-5</sup>.

Em estudos experimentais e clínicos, o tabagismo é um complicador da cicatrização<sup>2,6</sup>, causando desequilíbrio na resposta fisiológica normal, fato de particular interesse em Cirurgia Plástica e Reconstructiva.

A fim de simular a exposição passiva à fumaça do cigarro e baseados na literatura<sup>7-9</sup>, foi desenvolvido um aparato simples (Braga-Gazzalle), de baixo custo e de fácil manutenção, no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica - PUCRS (LHMPC), que utiliza basicamente o fluxo paralelo da fumaça.

Este estudo foi conduzido com o objetivo de validar o dispositivo desenvolvido em nosso Laboratório, através da presença de carboxihemoglobina no sangue de ratos expostos passivamente à fumaça do cigarro.

## MÉTODO

O sistema de inalação consistia em uma caixa de polipropileno de 40x33x17 cm, que foi dividida em 2 compartimentos por uma tela perfurada (Figuras 1 a 3). O compartimento maior foi usado para os ratos (até 5 simultaneamente) e o menor para os cigarros. Na extremidade oposta da caixa, foi fixado um ventilador (*cooler* de computador de 0,14 A), ligado à rede de 110 volts por meio de um transformador elétrico que fornecia tensão de 3 a 12 Volts. Este gerava um fluxo de ar contínuo dentro da caixa: a fumaça era aspirada pelo ventilador, atingia os ratos e saía do lado oposto da caixa. Durante o experimento, a caixa ficava fechada por uma tampa de madeira.

A marca de cigarro utilizada foi Marlboro, por ser de baixo custo (US\$ 1,80/maço com 20 cigarros) e com maiores teores de alcatrão (10 mg), monóxido de carbono (10 mg) e nicotina (0,8 mg).

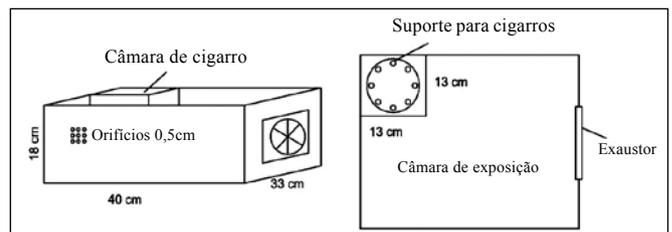
Após a aprovação do Comitê de Ética em nossa Instituição, e conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foram randomicamente selecionados 10 ratos do LHMPC e divididos em dois grupos de 5 animais cada: Grupo A (estudo) e Grupo B (controle).



**Figura 1** – Caixa sem a tampa. A divisória de metal isola os ratos do contato físico com o cigarro, permitindo que a fumaça passe livremente para o compartimento maior. Os orifícios permitem circulação do ar ambiente. Exaustor ligado ao transformador elétrico (canto inferior direito).



**Figura 2** – Vista superior do dispositivo.



**Figura 3** – Desenho esquemático e especificações do dispositivo. No compartimento menor, os cigarros são encaixados em um suporte de metal com 8 perfurações, onde ficam presos pela ponta onde está o filtro.

Foram utilizados ratos Wistar Kyoto saudáveis, fêmeas e machos, pesando entre 200 e 250 gramas. Os animais tiveram alimento e água “*ad libitum*”. Um período de aclimação à fumaça de 1 hora/dia por 1 semana foi utilizado para adaptar os ratos para o experimento<sup>3</sup>.

Ao final deste período, o Grupo A foi exposto diariamente à fumaça da queima de 8 cigarros, um após o outro, durante 2 horas. A exposição se deu nos dias úteis, por 4 semanas, e não aos finais de semana. O Grupo B foi submetido ao mesmo regime dentro da caixa, porém sem a fumaça. As exposições foram padronizadas e realizadas aproximadamente na mesma hora do dia.

Ao final da quarta semana do experimento, imediatamente após a exposição, os animais foram submetidos à coleta de sangue em busca de carboxihemoglobina (CoHb). O sangue foi coletado da veia jugular externa, dissecada sob anestesia, através de sistema de coleta em “capilar”. A analgesia foi realizada com paracetamol 10 gotas/50mL, via oral e a anestesia realizada de forma rotineira, antes de qualquer procedimento cirúrgico, com a utilização de solução de clorpromazina 0,2 mL + 0,8 mL de ketamina, 1 mL IM, para cada 250 gramas de peso. Os animais foram então sacrificados com cloreto de potássio (KCl) 5 mL intraperitoneal.

A análise estatística utilizada foi o teste t-Student, com 5% de significância.

## RESULTADOS

Os níveis de carboxihemoglobina obtidos estão ilustrados na Figura 4.

Os níveis de carboxihemoglobina observados no Grupo A foram estatisticamente muito maiores do que no Grupo B ( $p < 0,001$ ).

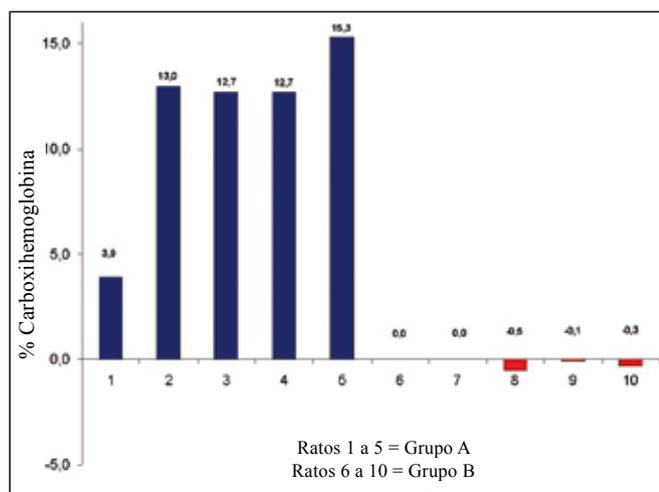


Figura 4 – Níveis de carboxihemoglobina.  $p < 0,001$ .

## DISCUSSÃO

Apesar do crescente interesse da saúde pública com relação aos efeitos adversos do tabagismo, o uso do tabaco é difundido nos mais variados ambientes, inclusive locais fechados. Entretanto, ainda são escassos dados na literatura sobre efeitos do tabagismo passivo nos mais variados órgãos e sistemas. Daí a importância dos Centros de Pesquisa em disponibilizar ferramentas para a execução de estudos envolvendo o tabagismo passivo.

A influência da exposição à fumaça do cigarro foi estudada em retalhos cutâneos confeccionados em ratos e hamsters, onde os resultados apontaram para déficit circulatório e necrose no retalho<sup>2-5</sup>.

Todos os estudos experimentais envolvendo tabagismo necessariamente utilizam algum dispositivo mecânico para submeter os animais à exposição da fumaça. Alguns utilizaram máquinas sofisticadas, com sistemas automáticos, porém caros e que necessitam maior manutenção e cuidados no manuseio<sup>2-4,10-13</sup> em comparação ao modelo desenvolvido.

Em nosso estudo, todos os ratos expostos à fumaça do cigarro apresentaram valores significativamente positivos de carboxihemoglobina, um método consolidado para confirmar e acessar a magnitude da exposição à fumaça<sup>2-3,5</sup>.

Mesmo com tamanho amostral reduzido, a hipótese de homogeneidade de variâncias - necessária no teste t de Student - foi aceita para a variável CoHb, com diferença significativa entre médias ao nível de 1%. Devido ao tamanho reduzido da amostra, optamos por testar os resultados também com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Novamente os resultados foram aceitos, com resultado também menor que 0,001.

Este aparato foi desenvolvido para possibilitar a pesquisa em tabagismo passivo em ratos, em qualquer área médica, no nosso Laboratório. O que chama a atenção é que o sistema foi validado com poucos animais, demonstrando resultados significativamente positivos de carboxihemoglobina, medidos por meio da coleta de sangue.

O modelo desenvolvido, que aproveita o fluxo paralelo de fumaça, provou que expõe adequadamente os animais dentro do compartimento. Além disso, o baixo custo e a simplicidade do dispositivo o tornam facilmente reproduzível em qualquer laboratório de pesquisa, aplicável, portanto, em países carentes de recursos. Acreditamos que, seguindo as especificações acima, mesmo em países subdesenvolvidos, será possível construir tal dispositivo. O custo total da montagem do dispositivo foi de US\$ 30,00.

## CONCLUSÕES

O modelo experimental desenvolvido pelos autores se mostrou confiável, de fácil manutenção e, sobretudo, de baixo custo operacional.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Gilmar P. Moreira, Daniel Rauber, Lourenço F. Teixeira, Luciana S. Lima, Pâmela S. Matos e Pedro Guarise, pelo apoio na realização deste trabalho. Não há fontes externas de fundos apoiando este trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Nelson E. The miseries of passive smoking. *Hum Exp Toxicol.* 2001;20(2):61-83.
2. van Adrichem LN, Hoegen R, Hovius SE, Kort WJ, van Strik R, Vuzevski VD, et al. The effect of cigarette smoking on the survival of free vascularized and pedicled epigastric flaps in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1996;97(1):86-96.
3. Nolan J, Jenkins RA, Kurihara K, Schultz RC. The acute effects of cigarette smoke exposure on experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1985;75(4):544-51.
4. Craig S, Rees TD. The effects of smoking on experimental skin flaps in hamsters. *Plast Reconstr Surg.* 1985;75(6):842-6.
5. Davies BW, Lewis RD, Pennington G. The impact of vasodilators on random-pattern skin flap survival in the rat following mainstream smoke exposure. *Ann Plast Surg.* 1998;40(6):630-6.
6. Aker JS, Mancoll J, Lewis B, Colen LB. The effect of pentoxifylline on random-pattern skin-flap necrosis induced by nicotine treatment in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(1):66-71.
7. Duarte JL, Faria FA, Ceolin DS, Cestari TM, Assis GF. Effects of passive smoke inhalation on the vocal cords of rats. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006;72(2):210-6.
8. Culhaci N, Meteoglu I, Dundar M, Kocak I. Histopathological evaluation of renal vascular changes in rats exposed to passive smoking. *Pathol Oncol Res.* 2005;11(2):121-4.
9. Visioli F, Galli C, Plasmati E, Viappiani S, Hernandez A, Colombo C, et al. Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. *Circulation.* 2000;102(18):2169-71.
10. Lee IW, Goh EK, Roh HJ, Lee CH, Chung BJ, Chon KM. Histologic changes in the eustachian tube mucosa of rats after short-term exposure to cigarette smoke. *Otol Neurotol.* 2006;27(3):433-40.
11. Uei H, Matsuzaki H, Oda H, Nakajima S, Tokuhashi Y, Esumi M. Gene expression changes in an early stage of intervertebral disc degeneration induced by passive cigarette smoking. *Spine.* 2006;31(5):510-4.
12. Freitas FA, Piccinato CE, Cherri J, Marchesan WG. Smoke inhalation exposure device for rats. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(3):824-6.
13. Florek E, Piekoszewski W, Kulza M, Szindzikaszwili T, Gomólka E, Chuchracki M, et al. Interaction between tobacco smoke and alcohol in animal models. *Pharmacol Rep.* 2008;60(6):985-90.

### Correspondência para:

Jefferson Braga Silva  
Av. Ipiranga, 6690 – Centro Clínico PUCRS – sala 216 – Porto Alegre, RS, Brasil – CEP 90610-000  
E-mail: jeffmao@terra.com.br