

SÍLVIA DE CARVALHO SCARPARO

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO COMBINADO SOBRE A
RESPOSTA MÚSCULO ESQUELÉTICA DE CAMUNDONGOS
EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO DE PALHA**

**CRICIÚMA
2017**

SÍLVIA DE CARVALHO SCARPARO

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO COMBINADO SOBRE A
RESPOSTA MÚSCULO ESQUELÉTICA DE CAMUNDONGOS
EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO DE PALHA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Aurino
de Pinho
Coorientadora: Profa. Dra. Renata
Tiscoski Nesi

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S286e Scarparo, Sílvia de Carvalho.

Efeitos do exercício físico combinado sobre a resposta músculo esquelética de camundongos expostos à fumaça de cigarro de palha / Sílvia de Carvalho Scarparo. - 2017.

84 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: Ricardo Aurino de Pinho.

Coorientação: Renata Tiscoski Nesi.

1. Fumo – Efeitos fisiológicos. 2. Fumaça de cigarro – Efeitos colaterais. 3. Disfunção musculoesquelética - Tratamento. 4. Exercícios físicos – Uso terapêutico. 5. Cigarro de palha. I. Título.

CDD 23. ed. 616.865

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

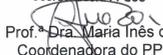
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 291

Com início às 10h00 (dez horas) do dia trinta e um do mês de julho de 2017 (dois mil e dezessete), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Silvia de Carvalho Scarparo**, sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho, intitulada "EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO COMBINADO SOBRE A RESPOSTA MÚSCULO ESQUELÉTICA DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO DE PALHA". A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof.ª Dra. Aline Partile Remor (Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 11h00 (onze horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.ª Dra. Maria Inês da Rosa, Coordenadora do Programa. Criciúma, 31 (trinta e um) de julho de 2017 (dois mil e dezessete).

Prof.ª Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora PPGCS


Prof.ª Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora do PPGCS


Diana Ghisi Daniel
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor Ricardo Pinho, primeiramente pela receptividade, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo! Agradeço pela sua contribuição no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos em relação à Ciência, que me levaram a execução e conclusão deste trabalho!

À Fisioterapeuta, pesquisadora e amiga, Renata Tiscoski Nesi, agradeço por ter me apresentado ao LAFIBE, depois de eu estar há muitos anos afastada “da vida acadêmica”!! Obrigada pela orientação e condução neste estudo, com todo o seu entusiasmo, competência e energia, desde o começo!!

À toda equipe do LAFIBE!! Aos colegas Emerson, Giulia, Pauline, Hérica, Priscila, Helen, Thais...aos alunos de ICs, que sempre me ajudaram! Desejo sucesso a todos!!!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Unesc, em especial ao Professor Paulo Silveira, à secretaria do PPGCS e a coordenação do curso de Fisioterapia, deixo aqui meu agradecimento!

Aos colegas de mestrado Jotele Fontana e Diogo Dominguiini!

Ao meu marido Cristiano, meu primeiro e principal incentivador!!... Pelo apoio total, emocional e financeiro...obrigada por insistir!

Ao João, meu filho, meu amor, uma criança feliz que vive as curiosas descobertas da infância...que faz tudo valer a pena!

À minha família, que mesmo de longe, sempre torce por mim!!

A todos os amigos! Patrícia e Silvana...“contar” com vocês fez toda a diferença nesses dois anos!!

Aos colegas de meu trabalho na Clínica, e aos meus pacientes da fisioterapia!

A todos que de alguma forma passaram pela minha vida, e a Deus por ter colocado todas essas pessoas em meu caminho !!

RESUMO

O tabagismo é considerado a principal causa de morte evitável no mundo e os indivíduos fumantes podem apresentar doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), disfunção cardiorrespiratória e músculo esquelética levando à redução da capacidade funcional. O exercício físico tem sido utilizado como meio terapêutico neste contexto. O tabaco pode ser consumido sob diversas formas. O cigarro industrializado apresenta mais de 7.000 substâncias tóxicas na sua composição. O cigarro de palha apresenta poucos dados sobre sua composição e possíveis efeitos sobre o sistema músculo esquelético. O presente estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos do exercício físico combinado, modalidade que associa exercícios aeróbios e de força, sobre a resposta músculo esquelética induzida pela exposição crônica à fumaça de cigarro de palha. Material e Métodos: Foram utilizados 48 camundongos Swiss machos, com 60 dias de idade, divididos randomicamente em 4 grupos (n=12): grupo 1- ar ambiente: sedentário + ar ambiente, 2- sedentário + à fumaça de cigarro de palha, 3- exercício combinado + ar ambiente, 4- exercício combinado + fumaça de cigarro de palha. Os animais foram expostos a um protocolo de inalação passiva à fumaça de cigarro de palha por 30 dias consecutivos associado a um protocolo de exercícios físico combinado. Após 48 horas da última exposição, os animais foram submetidos a eutanásia e amostras de músculo quadríceps foram seccionadas e armazenadas para posteriores análises de conteúdos de proteínas do complexo inflamassoma NLRP3, ASC, da caspase-1 clivada e ONOO⁻, dos níveis de TGF- β , DCF, NO, GSH, GSSH, MPO, dano em DNA e análise histológica do tecido muscular. Resultados: Foi observado que houve uma diminuição significativa na área da fibra muscular no grupo exercício combinado + cigarro de palha, alterações significativas no equilíbrio redox e aumento de danos em DNA no grupo exposto à fumaça de cigarro de palha + exercício, além de modulação de mediadores do complexo inflamassoma NLRP3. Conclusão: Mesmo com aumento na resposta antioxidante, o cigarro de palha impediu que o exercício modulasse positivamente a morfologia da fibra muscular, demonstrando que em condições de fumaça de cigarro de palha, considerada quadro de hipóxia, a intensidade e tipo de exercício tem papel chave sobre a capacidade de regeneração e hipertrofia muscular.

Palavras-chave: cigarro de palha, inflamassoma, exercício combinado, disfunção músculo esquelética, DPOC.

ABSTRACT

Smoking is considered the leading cause of preventable death in the world and smokers may present chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cardiorespiratory dysfunction and skeletal muscle leading to reduced functional capacity. Physical exercise has been used as a therapeutic medium in this context. Tobacco can be consumed in various forms. The industrialized cigarette has more than 7,000 toxic substances in its composition, however, in relation to the straw cigarette the data regarding its composition and the possible effects on the musculoskeletal system are unknown. The present study aimed to evaluate the effects of combined physical exercise, a mode that associates aerobic and strength exercises, on the activation of inflamassome in muscle skeletal dysfunction induced by chronic exposure to strawberry smoke. Materials and Methods: 48 male Swiss mice, 60 days old, randomly divided into 4 groups (n = 12) were used: group 1 control: untrained - ambient air, 2- untrained - exposed to smoke, 3- Combined Exercise - Ambient Air, Combined Exercise 4 - Strawberry Smoke. The animals were exposed to a passive inhalation protocol to the strawberry cigarette smoke for 30 consecutive days associated with an exercise protocol. After 48 hours of the last exposure, the animals were submitted to euthanasia and muscle samples were sectioned and stored for further analysis of the protein content of the inflammatory complex NLRP3, ASC, caspase-1, ONOO and the levels of TGF- β , DCF, NO, GSH, GSSH, MPO, DNA damage, histological analysis of muscle tissue and morphometry Results: It was observed that there was a significant decrease in muscle fiber area in the combined exercise + straw cigarette group, significant changes in redox balance and increased DNA damage in the group exposed to cigarette smoke + exercise, in addition to modulation of mediators Inflammatory complex NLRP3. Conclusion: Even with an increase in the antioxidant response, the straw cigarette prevented the exercise positively modulating the muscle fiber morphology, demonstrating that under conditions of strawberry smoke, considered hypoxia, the intensity and type of exercise play a key role on the capacity of regeneration and muscle hypertrophy.

Keywords: straw cigarette, inflamassome, combined exercise, skeletal muscle dysfunction, COPD.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AKT – serina/treonina quinase, do inglês *serine/threonine kinase 1*
- ANOVA - Análise de Variância
- ASC – Proteína speck-like associada à apoptose com domínio de recrutamento de caspase, do inglês *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*
- ATP – Trifosfato de adenosina, do inglês *adenosine triphosphate*
- Ca²⁺ - Cálcio
- CARD – domínio efetor de recrutamento de caspases, do inglês *caspase recruitment domain*
- CAT – Catalase
- CDC - Centro de controle e prevenção de doenças do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*
- CEUA – Comitê de Ética Para o Uso de Animais
- CID 10 – Cadastro internacional de doenças.
- CO – Monóxido de carbono
- CP – cigarro de palha
- COHb – carboxihemoglobina
- CS – célula satélite
- DAMPs – padrões moleculares associados a danos, do inglês, *danger-associated molecular patterns*
- DCF – 2', 7'-di-clorofluoresceína do inglês *2,7-Dichlorodihydrofluorescein*
- DCNT – Doença crônica não transmissível
- DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*
- DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- ERNs – Espécies reativas de nitrogênio
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- FEV₁/FVC – razão entre Volume Expiratório Forçado no Primeiro segundo / Capacidade Vital Forçada
- FFM – massa livre de gordura, do inglês *fat-free mass*
- FoxO – fator de transcrição, do inglês *forkhead box O*
- GOLD – Iniciativa Global para a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, do inglês *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*
- GPx – Glutationa peroxidase, do inglês *Glutathione peroxidase*
- GSH – Glutationa reduzida, do inglês *Glutathione reduced*
- GSSG – Glutationa oxidada, do inglês *Glutathione oxidized*
- Hb – Hemoglobina
- HE – Hematoxilina e Eosina

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-18 – Interleucina 18 do inglês, *interleukin-18*
IL-1 β – Interleucina 1 beta, do inglês *Interleukin-1 β*
INCA – Instituto Nacional de Câncer
KO – nocaute, do inglês *knock-out*
LBA – lavado broncoalveolar
MHC – cadeia pesada de miosina do inglês *major histocompatibility complex*
MRF4- fator de transcrição miogênico do inglês *Myogenic regulatory factors*
mTOR - alvo da rapamicina de mamíferos
MYf5 – fator de transcrição miogênico, do inglês *Myogenic regulatory factors*
MYOD – fator de transcrição miogênico, do inglês *Myogenic regulatory factors*
NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfatado inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NF-kB – fator nuclear kappa B
NLRP3 – Proteínas receptoras do tipo NOD, do inglês *nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3*
NOD – proteína contendo domínio de ligação nucleotídica
NOX4 - NOX família de NADPH oxidases do inglês *NOX family of NADPH oxidases*.
nNOS - óxido nítrico sintase do inglês *Nitric oxide synthases*
O₂ – molécula de Oxigênio
OMS – Organização Mundial da Saúde
ON – Óxido nítrico
ONOO⁻ – Peroxinitrito
PAMPs – padrões moleculares associados à patógenos, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*
PETAb – Pesquisa nacional por amostra de domicílio/Tabagismo
PKB – proteína quinase B do inglês, *serine/threonine kinase protein kinase B*
PRR – Receptores de reconhecimento padrão do inglês *Pattern Recognition Receptors*
PTA – poluição tabagística ambiental
RL – radical livre
ROS – espécies reativas de oxigênio do inglês *Reactive oxygen species*
SNC – sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

TLRs – receptores do tipo Toll do inglês *toll-like receptors*

TNF α – fator de necrose tumoral alfa

UbP – via da ubiquitina-proteassoma

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

VO₂ – volume de oxigênio

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 23 |
| 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO | 23 |
| 1.1.1 O consumo do tabaco | 23 |
| 1.1.2 A composição da fumaça do tabaco..... | 24 |
| 1.1.3 Principais formas do consumo do tabaco - O cigarro de palha..... | 26 |
| 1.1.4 Alterações biológicas causadas pela fumaça do cigarro: DPOC..... | 27 |
| 1.1.5 A Disfunção Músculo Esquelética associada ao tabagismo..... | 29 |
| 1.1.6 O estresse oxidativo e a inflamação associados a fumaça de cigarro..... | 33 |
| 1.1.7 O inflamassoma..... | 35 |
| 1.1.8 Exercício físico na função muscular..... | 39 |
| 1.2 JUSTIFICATIVA | 41 |
| 2 OBJETIVOS | 42 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 42 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 42 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 43 |
| 3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS | 43 |
| 3.2 ANIMAIS | 43 |
| 3.3 PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO | 43 |
| 3.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO | 44 |
| 3.5 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS | 45 |
| 3.5.1 Lavabo broncoalveolar..... | 45 |
| 3.5.2 Contagem de leucócitos total na câmara de Neubauer..... | 46 |
| 3.5.3 Ensaio Cometa..... | 46 |
| 3.6 ENSAIOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES | 46 |
| 3.6.1 Análises Bioquímicas..... | 46 |
| 3.6.2 Método de ELISA..... | 47 |
| 3.6.3 Análise por Western Blotting..... | 47 |
| 3.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA | 48 |
| 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 48 |
| 4 RESULTADOS | 49 |

| | |
|--------------------------|-----------|
| 5 DISCUSSÃO | 57 |
| 6 CONCLUSÃO | 64 |
| REFERÊNCIAS | 65 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 O consumo do tabaco

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o tabagismo, considerado uma doença, é a maior causa de morte evitável em todo o mundo. Estima-se que um terço da população mundial adulta, isto é, 1 bilhão e 200 milhões de pessoas sejam fumantes. Mundialmente, o consumo de produtos do tabaco é responsável por cerca de seis milhões de mortes ao ano, correspondendo a mais de 10 mil mortes por dia (INCA, 2014; OMS, 2016). Mantendo o padrão do consumo atual, presume-se que em 2030, o número de mortes/ano passe para oito milhões em consequência deste hábito, sendo 70% em países em desenvolvimento (WHO, 2015).

O fumo é o único agente que, não sendo bactéria ou vírus, adquiriu características epidêmicas pelos malefícios à saúde da população, sendo considerado um grande problema de saúde pública (Rosemberg, 2002). No Brasil, cerca de 200.000 mortes/ano são decorrentes do tabagismo, e de maneira geral, tal incidência é consequência das inúmeras doenças associadas à ação prejudicial dos componentes químicos inalados do cigarro (INCA, 2011).

O reconhecimento do tabagismo como importante problema de saúde pública alavancou o surgimento de medidas de saúde para conter o avanço da utilização do tabaco. No Brasil, existe um Plano de Ações Estratégicas para o enfrentamento das Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT), este programa visa a prevenção e o controle das doenças crônicas e seus fatores de risco (INCA, 2015). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de tabaco em folha (14,1% da produção mundial), atrás apenas da China, e é o maior exportador de fumo do mundo. (AFUBRA, 2016; Malta et al., 2015). De acordo com o Ministério da Saúde (2017), o número de brasileiros fumantes atinge cerca de vinte e um milhões, porém dados indicam que este número vem diminuindo devido às campanhas de combate ao tabaco.

Entende-se por tabagismo o consumo de qualquer derivado do tabaco, produtor ou não de fumaça, apresentado sob diferentes formas (Viegas, 2008). É amplamente reconhecido como doença crônica gerada pela dependência da nicotina, estando por isso inserido na Classificação Internacional de Doenças (CID10) da OMS (Ministério da Saúde, 2006).

A nicotina contida no tabaco possui propriedades psico-estimulantes, libera dopamina e aumenta a produção de noraepinefrina, sendo a responsável pela dependência, especialmente pelas propriedades euforizantes e ansiolíticas (Rosemberg, 2003). O tabaco tanto pode ser um fator de risco para a ocorrência de diversas doenças, como também pode ser um fator agravante para o controle de uma doença que o indivíduo fumante já seja portador (CDC, 2008).

Evidências epidemiológicas atuais apontam uma relação de causalidade entre o tabagismo e cerca de 50 doenças, sendo responsável por 63% dos óbitos relacionados às DCNTs. Dessas, o tabagismo é responsável por 85% das mortes por doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), 30% por diversos tipos de câncer (pulmão, boca, laringe, faringe, esôfago, pâncreas, rim, bexiga, colo de útero, estômago e fígado), 25% por doença coronariana (angina e infarto) e 25% por doenças cerebrovasculares (acidente vascular cerebral) (WHO, 2011). Para cada pessoa que morre por causa do tabagismo, pelo menos 30 pessoas vivem com uma grave doença relacionada ao hábito de fumar (CDC, 2017). Inúmeros estudos têm investigado seus efeitos sobre o organismo de pessoas fumantes, entretanto, fumantes passivos também podem apresentar sintomas respiratórios por inalação de partículas e gases nocivos aos pulmões e também apresentar um estado de saúde comprometido (GOLD, 2016).

O tabagismo passivo é a inalação por indivíduos não-fumantes da fumaça proveniente da queima de derivados do tabaco como o cigarro, cigarro de palha, charuto, narguilé e outros. Também é denominado exposição involuntária ao fumo ou poluição tabágica ambiental (PTA) (Reichert et al., 2008). Segundo a OMS, o tabagismo passivo mata cerca de 600 mil não-fumantes todos os anos no mundo, dos quais 165 mil são crianças menores de 5 anos (INCA, 2017).

1.1.2 A composição da fumaça do tabaco

O tabaco é um produto agrícola que apresenta constituintes utilizados para a fabricação de diferentes tipos de cigarro. São gerados a partir de folhas de plantas do gênero *Nicotiana*, que absorve e retém elementos tóxicos presentes em adubos, fertilizantes e pesticidas (Meirelles, 2009). A fumaça do tabaco é uma mistura de gases e partículas, com uma composição química complexa de mais de 8.700 constituintes químicos identificados e com propriedades físicas específicas, que interagem com células, tecidos e órgãos do corpo

humano após inalação (Rodgman e Perfetti, 2013). Centenas desses constituintes são tóxicos, incluindo 70 componentes que podem causar câncer em vários órgãos e sistemas orgânicos (CDC, 2010). Esses efeitos estão diretamente relacionados à duração e ao grau de exposição à fumaça do tabaco, não existindo níveis considerados seguros de consumo (Achutti et al., 2004; WHO, 2014).

A fumaça do cigarro contém substâncias químicas e gases reativos, capazes de gerar radicais livres (RL), as quais apresentam um papel central na patogênese de danos pulmonares (Valença et al., 2004). É constituída por uma mistura de substâncias tóxicas heterogêneas, apresentando uma fase gasosa e outra particulada. De acordo com Duarte (2006), três substâncias se destacam na composição química da fumaça do cigarro: a nicotina, o monóxido de carbono (CO) e o alcatrão. A fase gasosa é composta, principalmente, por CO, amônia, cetonas, formaldeído, acetaldeído e acroleína. A fase particulada contém nicotina, e alcatrão (Spada et al., 2006).

A nicotina é um produto químico anti-herbívoro derivado da planta de tabaco *Nicotiana sp* e é geralmente usado como um inseticida (Rodgman e Perfetti, 2013). É a principal responsável pela dependência do fumante, além de ativar a resposta simpática aumentando a frequência cardíaca e contribuindo para a hipertensão arterial, também libera substâncias quimiotáxicas atraindo células polimorfonucleares contribuindo para o dano pulmonar. A ação da nicotina aumenta a liberação de catecolaminas, causando vasoconstrição, acelerando a frequência cardíaca, causando hipertensão arterial e provocando uma maior adesividade plaquetária. Em parceria com o monóxido de carbono, a nicotina causa várias doenças cardiovasculares; estimula a produção de ácido clorídrico no aparelho gastrointestinal, o que pode causar úlcera gástrica, e desencadeia a liberação de substâncias quimiotáxicas no pulmão, que estimulará um processo que irá destruir a elastina, provocando o enfisema pulmonar (Rosemberg 1987, INCA 2002). As concentrações de nicotina no sangue arterial aumentam rapidamente após uma tragada, e diminuem à medida que a nicotina é redistribuída para outros tecidos do corpo, principalmente nos músculos esqueléticos. É por isso que os fumantes, geralmente sentem necessidade de fumar um cigarro a cada meia hora, a fim de manter um nível satisfatório de nicotina (Dale et al. 2001).

O CO tem 250 vezes mais afinidade com a hemoglobina (Hb) presente nos glóbulos vermelhos do sangue do que o oxigênio (O₂). A ligação do CO com a Hb, forma o composto quimicamente estável,

chamado carboxihemoglobina (CoHb), que dificulta a oxigenação do sangue e priva alguns órgãos do O₂, contribuindo assim, para o desenvolvimento de diversas doenças. O alcatrão é composto por 43 substâncias comprovadamente carcinogênicas que incluem entre outros, o arsênico, níquel, benzopireno e cádmio (Elsayed e Bendich, 2001; Vaart et al., 2004; Duarte, 2006).

Essas substâncias podem causar alteração na estrutura celular e no estado redox pulmonar (Elsayed e Bendich, 2001; Gochman et al., 2007). Estudos demonstram que após a inalação contínua de fumaça do cigarro, macrófagos, neutrófilos e outras células migram para o interstício pulmonar, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs), ou espécies reativas de Nitrogênio (ERNs) adicionais, que alteram diretamente a membrana das células intersticiais e do endotélio (Gerritsen et al., 2005; Sadowska et al., 2005).

1.1.3 Principais formas de consumo do tabaco – O cigarro de palha

O tabaco pode ser utilizado de diversas formas, divididos em produtores e não produtores de fumaça (West e Shiffman, 2007). Independente da maneira como é consumido, traz malefícios à saúde e, nesse sentido, estudos apontam para a importância do monitoramento deste consumo. (Viegas, 2008; Giovino et al., 2012; Szkol et al., 2011).

Dentre as formas de tabaco fumado mais investigadas destacam-se: cigarros industrializados, cigarros de palha ou enrolados à mão, cigarros indianos (conhecidos como “bidis”), cigarros de cravo (ou “de bali”), cachimbos, charutos ou cigarrilhas e narguilé (INCA, 2011; Giovino et al., 2012; Szklo et al., 2011). Porém os cigarros industrializados têm sido alvo na maioria das pesquisas visando sua caracterização físico-química (Javadian, et al., 2015), bem como os efeitos nocivos para a saúde (Valavanidis et al., 2013; Almeida et al., 2014; Gea et al., 2015; Huang et al., 2016), uma vez que é a forma de consumo predominante.

Atualmente, observa-se um aumento do consumo de cigarros de palha, de cravo, bidis e narguilé em todo o mundo. De acordo com INCA (2011), o cigarro de palha é o segundo cigarro mais consumido pela população brasileira, com 5,1%, somente ficando atrás do cigarro industrial que é o mais consumido no país, com 14,4%. Este cigarro é conhecido pela população como um cigarro artesanal, não industrializado e sem filtro. É constituído basicamente por uma porção de tabaco macerado envolvido por uma palha de milho, na maioria das

vezes confeccionado manualmente. Dados divulgados em 2008 conforme a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio (PETab) demonstravam uma maior proporção de fumantes de cigarro de palha ou enrolados à mão em áreas rurais do Brasil, em comparação com as áreas urbanas (13,8% vs. 3,6%), entretanto, não existem novos números que confirmem a situação atual. Vale ressaltar ainda, que o cigarro de palha na sua grande maioria, não é comprado pronto em forma de maço, e sim, enrolado à mão. Isso significa que o fumante não recebe qualquer advertência sobre os efeitos de seu consumo (PETab 2008; INCA, 2011). Dados anteriores demonstram que o cigarro de palha pode aumentar o desenvolvimento de bronquite crônica e câncer de cavidade oral (Menezes, 1997; Niel, 2008). No entanto, pouco se sabe sobre a amplitude de seus efeitos biológicos. Visto uma tendência ao crescimento de seu consumo e a preocupação com seus possíveis efeitos inflamatórios, oxidativos e mecanismos de lesão, diversas perguntas intrigam a comunidade científica. Um recente estudo de nosso grupo sugeriu que o CP pode ser altamente prejudicial, semelhante ao cigarro industrializado, causando danos histológicos em vários tecidos (Camera et al., 2016).

1.1.4 Alterações biológicas causadas pela fumaça do cigarro: DPOC

De acordo com GOLD (2016), o tabagismo é o principal fator de risco para a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). Devido a isso, a maioria dos estudos referentes aos danos biológicos da fumaça do cigarro estão relacionadas a essa patologia. A DPOC é uma enfermidade respiratória prevenível e tratável, que se caracteriza pela presença de obstrução crônica do fluxo aéreo irreversível. A obstrução do fluxo aéreo é geralmente progressiva e está associada à uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas ou gases tóxicos. Frequentemente coexiste com outras comorbidades, e testes de função pulmonar, como a espirometria, são necessários para fazer um diagnóstico clínico (GOLD, 2016).

Atualmente, são considerados pacientes portadores de DPOC, àqueles que apresentam cronicidade dos seguintes sintomas: tosse, hipersecretividade e dispneia, além da presença de $FEV_1/FVC < 70\%$ pós-broncodilatador no teste espirométrico, que confirma a limitação de fluxo aéreo persistente. Conceitualmente, podendo ou não apresentar o quadro de bronquite crônica e enfisema (GOLD, 2016). A DPOC é a

terceira causa de morte global e cuja prevalência ainda está aumentando (Tashkin e Murray, 2009; Parikh et al., 2016). Essa patologia estende-se para além do ambiente pulmonar, dando origem a efeitos sistêmicos e ao desenvolvimento de uma série de comorbidades, incluindo perda de massa muscular, depressão, doenças cardiovasculares e osteoporose (Barnes e Celli, 2009). Tais condições contribuem fortemente para a disfunção músculo esquelética característica do paciente portador de DPOC como demonstra a Figura 1.

Em resposta à disfunção muscular, a diminuição de atividade física é uma característica importante dos pacientes com DPOC e tem recebido muita atenção em pesquisas recentemente (Gimeno et al., 2014; Watz et al., 2014; Waschki et al., 2015). O exercício físico tem sido utilizado afim de minimizar tais sintomas. Embora os seus benefícios na função pulmonar sejam limitados, o exercício físico com intensidade moderada melhora o sistema imunológico pulmonar e a capacidade cardiopulmonar, além de minimizar a disfunção muscular periférica (Celli et al., 2004; Vieira et al., 2008).

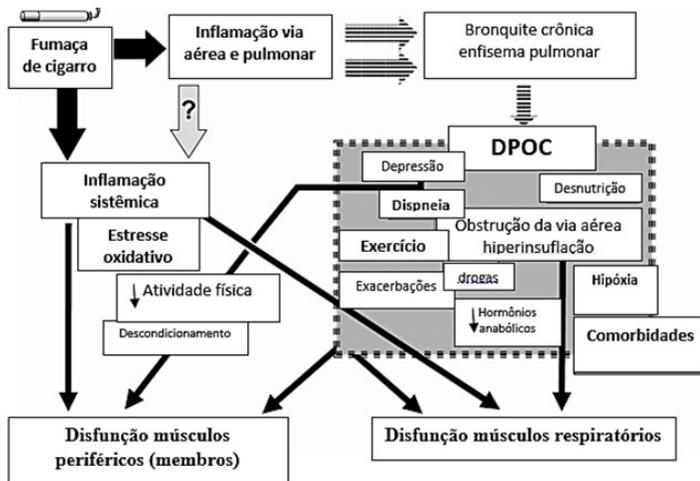


Figura 1: Mecanismos associados à Disfunção músculo esquelética. As consequências do tabagismo incluem inflamação local (pulmonar) e sistêmica. O primeiro conduzirá a alterações pulmonares características da DPOC, enquanto que esta parece estar ligada às suas manifestações extrapulmonares, incluindo a disfunção muscular. No entanto, os principais fatores etiológicos deletérios para disfunção muscular são hiperinsuflação pulmonar para músculos respiratórios e descondicionamento para músculos dos membros. DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica. Fonte: adaptado de J Thorac Dis, 2015.

1.1.5 A Disfunção Músculo Esquelética associada ao tabagismo

A Disfunção músculo esquelética, que é caracterizada pela atrofia muscular é provavelmente, a manifestação sistêmica mais extensamente estudada da DPOC e pode envolver tanto os músculos respiratórios como os periféricos (Maltais et al., 2014). Histologicamente, a atrofia muscular caracteriza-se por uma diminuição da densidade de volume miofibrilar relativamente aos volumes mitocondrial e do retículo sarcoplasmático (Caiozzo et al., 1996). As alterações do músculo atrofico, a nível celular são: dissolução do sarcômero e degradação endotelial, redução do número de mitocôndrias, acúmulo de tecido conjuntivo, e diminuição da densidade capilar e do número de mionúcleos. E na aparência macroscópica mostra uma redução considerável na secção transversa do músculo (Boonyarom e Inui, 2006).

O músculo esquelético pode ser caracterizado como um tecido dinâmico e de alta plasticidade, extremamente adaptável a diferentes situações e estímulos e representa aproximadamente 50% do peso corporal total (Nader, 2005; Rennie, 2005). Os músculos diferem-se quanto às suas propriedades contráteis e energéticas, sendo dependentes da isoforma de miosina de cadeia pesada (MHC) que predomina em cada tipo de fibra (D'antona et al., 2006). É composto por uma variedade de tipos e subtipos de fibras rápidas e lentas (i.e., lento: I, rápido: IIb, IIc e IIa ou misturas). Além disso, as fibras musculares são versáteis e capazes de alterar propriedades fenotípicas em resposta a diversos fatores, mostrando modificações na expressão de isoformas de MHC. Por conseguinte, quando as fibras rápidas sofrem processo de atrofia, ocorre uma transição de fibras rápidas para a lentas (por exemplo, IIb → IIc → IIa → I) (Pette e Staron, 2000; Higashino et al., 2013).

A disfunção muscular pode ser definida como a situação em que os músculos esqueléticos mostram resistência reduzida, sendo incapazes de desempenhar adequadamente as suas tarefas fisiológicas. (Gea et al., 2015). O termo atrofia, é definido como a redução do tamanho das células e órgãos, como resultado da diminuição do fornecimento de nutrientes ou seu desuso; associada à diminuição da síntese de elementos constituintes celulares e degradação crescente de organelas celulares (Kummar et al., 2016). Outros autores definem a hipotrofia como diminuição da massa muscular com capacidade de regeneração, e a atrofia como sendo a cronicidade de uma hipotrofia levando a

inutilização de um grupo muscular (Caiozzo et al., 1996; Boonyarom e Inui, 2006; Gea et al., 2015). Ainda não há um consenso sobre a diferenciação entre esses dois termos, observa-se, entretanto, que na maioria dos estudos, no caso do músculo esquelético, o termo “atrofia” é o mais utilizado, e vêm sendo utilizado como sinônimo de “hipotrofia”.

O processo atrofico constitui uma resposta do tecido muscular em situações de tensão e/ou de carga mecânica reduzida, na tentativa de manter um funcionamento eficiente e ajustado às novas exigências funcionais (Edgerton et al., 2002). É altamente ordenado e regulado, acompanhado por inúmeras alterações metabólicas, bioquímicas e estruturais que se repercutem na funcionalidade dos músculos afetados (Appell, 1990). Desta forma, a diminuição do volume muscular e a redução drástica da capacidade deste em gerar força, constitui uma característica funcional da atrofia, e está diretamente relacionada com a diminuição da área transversa das fibras que compõem o músculo, e com a perda de proteínas contráteis (Deschenes et al., 2002; Jackman e Kandarian, 2004).

Diferentes condições fisiológicas podem levar ao processo de atrofia muscular, assim como, podem estar associadas às situações patológicas. Ocorrendo como consequência da denervação, lesão, imobilização articular, repouso em cama, tratamento com glicocorticoides, sepse, câncer e envelhecimento (Michael, 2000; Jagoe e Goldberg, 2001). A perda de massa muscular esquelética, denominada "atrofia", é uma característica diagnóstica da caquexia observada em cenários de câncer, doença cardíaca, DPOC avançada, doença renal e queimaduras (Clarke et al., 2007; Cohen et al., 2009). A qualidade muscular é determinada pelo equilíbrio entre a síntese proteica e sua degradação, que é controlada em detalhes por vias de sinalização específicas (Glass, 2005). Um desequilíbrio entre estas vias pode levar a uma perda rápida e significativa de massa muscular, uma vez que 80% das proteínas do músculo esquelético são proteínas miofibrilares. Quando tal equilíbrio não ocorre, a massa muscular é reduzida, causando um impacto importante sobre a função muscular. (Haddad et al., 2003).

Existem quatro vias proteolíticas conhecidas que contribuem para a atrofia muscular: a via das catepsinas ou lisossomais, via das calpaínas dependentes de cálcio (Ca^{+2}), via das caspases e da ubiquitina proteassoma dependente de ATP (UbP) (Kandarian e Stevenson, 2002; Kandarian e Jackman, 2006). O sistema UbP é o principal mecanismo do catabolismo protéico no músculo esquelético dos mamíferos. Nesta

via, as proteínas são marcadas inicialmente pela degradação por ubiquitinação e são subsequentemente reconhecidas e processadas pelo proteassoma, o núcleo catalítico da via. A inflamação e o estresse oxidativo também têm sido implicados na ativação desse sistema (Maltais et al., 2014).

Enquanto o sistema UbP é o principal mecanismo do catabolismo protéico, uma das principais vias de sinalização para síntese de proteínas é a via clássica da AKT. A proteína AKT ou serina/treonina quinase ou ainda PKB (proteína quinase B) exerce um papel fundamental na sinalização intracelular para síntese de proteínas. Quando ativada, através de estímulos diversos como hormônios e citocinas, poderá tanto inibir vias de degradação protéica, ao restringir a translocação nuclear de FoxO, assim como ativar vias de sinalização para síntese de proteínas (Bodine et al., 2001; Yamada et al., 2012; Leger et al., 2006). Dessa forma, torna FoxO inativo localizado ancorado no citoplasma, entretanto, se a atividade da Akt estiver reduzida, permite a translocação nuclear de FoxO, que passa a exercer seu papel transcricional de genes do sistema proteolítico. A inativação da Akt pode permitir a ativação da via da FoxO culminando com a degradação protéica (Sandri et al., 2004).

Porém, o sistema muscular apresenta um mecanismo de regeneração que está presente no equilíbrio proteolítico muscular e também no processo de dano muscular, conhecido como miogênese, que é mediado principalmente por células satélites (CS), consideradas células pluripotentes no tecido muscular. As CS são precursoras miogênicas indiferenciadas que possuem a habilidade de gerar novas fibras musculares ou gerar novos mionúcleos para células contráteis durante o crescimento pós-natal, podendo se ativar e se proliferar - gerando novas fibras musculares - ou retornar para o estado quiescente (Vierck et al., 2000; Kadi et al., 2005; Wahl et al., 2008; Chang e Rudnicki, 2014). Quando ativadas, as CS expressam vários fatores transcricionais, entre eles, os fatores reguladores miogênicos MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 (Holterman e Rudnicki, 2005). O MyoD é um marcador para CS ativadas, sendo encontrado em elevados níveis no músculo em regeneração e de neonatos, o Myf-5 (da mesma família do MyoD) marca as CS quiescentes e ativadas, e a Miogenina e MRF4 atuam tardiamente na miogênese, durante a diferenciação celular. (Holterman e Rudnicki, 2005).

As CS desempenham um papel central durante a regeneração muscular sob condições patológicas ou fisiológicas como no mecanismo

de hipertrofia (Sambasivan et al., 2011). Neste processo ocorre ativação, proliferação e migração das CS para contribuir com o crescimento muscular (Dhawan e Rando, 2005).

O exercício físico pode causar pequenos traumas na fibra muscular, ocasionando a infiltração de macrófagos, e a liberação de fatores de crescimento que regulam a população de CS durante a regeneração (Hawke e Garry, 2001). Induzindo a quimiotaxia e fusão das CS às fibras musculares pré-existentes, além do aumento da área seccional da fibra e do número de mionúcleos (Kadi et al., 1999). A regulação metabólica para a ativação das CS pode ocorrer em resposta a várias condições, incluindo hipóxia, estresse oxidativo, inflamação, exercício e envelhecimento, sendo um processo coordenado por genes musculares específicos (Segalés et al., 2015).

Estudos recentes demonstram que pacientes com DPOC tem diminuição de massa muscular, sugerindo que a exposição crônica à fumaça de cigarro pode interferir na qualidade músculo esquelética de indivíduos tabagistas (Barnes, 2014). A perda de massa muscular, embora não seja uma condição diretamente fatal, reduz a qualidade de vida relacionada à saúde e diminui a capacidade de sobrevivência para pacientes com DPOC. A principal característica é a redução da massa livre de gordura (FFM) e está associada a fraqueza dos músculos periféricos, comprometimento do estado funcional e à má qualidade de vida relacionada à saúde (Schols et al., 2005; Mathur et al., 2014). O tabagismo também está associado à fraqueza do músculo esquelético em indivíduos saudáveis (Seymour et al., 2010; Barreiro et al., 2011; van den Borst et al., 2011). A atrofia muscular exacerba o declínio da função física, o que provoca uma maior deterioração da função pulmonar, limitação do exercício e mau estado de saúde (Agusti et al., 2003).

As substâncias tóxicas contidas na fumaça de cigarro estimulam a degradação da proteína muscular e prejudicam a síntese proteica (Rom et al., 2012). O hábito de fumar e/ou a exposição à fumaça de cigarro é o principal agente causal da DPOC (Eisner et al., 2010), entretanto, estudos indicam que indivíduos fumantes não-portadores da DPOC também apresentam o processo de atrofia muscular.

Visto que, condições patológicas alteram a miogênese, a hipóxia pode ser um fator que impulsiona mudanças no tecido muscular, levando à ativação do sistema UbP e redução da miogênese (Caron et al., 2009). Pode também potencializar a resposta inflamatória proporcionando um mecanismo adicional à atrofia muscular (Gonzalez e Wood, 2010). De acordo com Faucher et al. (2004), a hipoxemia

também pode comprometer a capacidade oxidativa muscular e a capilarização, e predispor à fadiga muscular.

Os mecanismos relacionados à essa baixa oxigenação são a ação vasoconstritora, promovida pela nicotina e o acréscimo de COHb no sangue (Nakatani et al., 2003). Estudos já identificaram que em situações de baixo fornecimento de oxigênio o tecido muscular sofre atrofia e fagocitose de fibras, levando-o em direção a um estado catabólico.

1.1.6 O estresse oxidativo e a inflamação associados a fumaça de cigarro

Adicionalmente, a influência do estresse oxidativo e da inflamação são dois importantes fatores que contribuem para a atrofia músculo esquelética (Hoppeler e Vogt, 2001; van Hall, 2012; Barnes, 2014). A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (Halliwell e Whiteman, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2007). É uma manifestação bioquímica de agressão às biomoléculas e está associado a complicações cardiovasculares, neurológicas, endócrinas e musculares, dentre outras (Varizi, 2004).

Sob condições fisiológicas normais, a maioria das espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas na cadeia respiratória mitocondrial, pela qual 2-5% do oxigênio (O₂) é desviado para a formação de RLs. Entretanto, as EROs podem ser geradas em outros eventos bioquímicos celulares como processos inflamatórios, isquemia/reperfusão, oxidação de catecolaminas, entre outros eventos oxidativos (Halliwell e Gutteridge, 2007).

EROs estão envolvidas em vários processos essenciais à vida humana, são fundamentais nos efeitos de danos e também na adaptação que acompanham o exercício físico (Sachdev et al., 2008). Em contrapartida, a fumaça de cigarro é um facilitador do estresse oxidativo, visto que estudos demonstram que após a inalação contínua, macrófagos, neutrófilos e outras células migram para o interstício pulmonar, produzindo EROs e causando danos às biomoléculas

(Gerritsen et al., 2005; Sadowska et al., 2005; Menegali et al., 2009). A hipóxia altera a eficiência da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, induzindo vazamento de elétrons para oxigênio molecular e gerando também EROs (Murray, 2009).

Devido à ausência de literatura sobre outros tipos de cigarro, os estudos que relacionam a inalação da fumaça a partir do consumo e o efeito sobre estado redox celular estão concentrados no cigarro industrializado. A fumaça de cigarro contém um grande número de oxidantes que têm efeitos adversos sobre os tecidos por meio de dano oxidativo (Valença et al., 2004; Rahman e Macnee, 2005; Barreiro et al., 2010). Frente a isso, o sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos RL ou das espécies reativas não-radicaís e ainda favorecer o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (Koury e Donangelo, 2003; Bernard e Krause, 2007).

O pulmão apresenta um sistema de defesa com elevada atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) (Halliwell e Gutteridge, 1999). Park et al. (1998) testou o efeito do fumo sobre os marcadores de estresse oxidativo e demonstrou maiores níveis de glutathione oxidada (GSSG) e diminuição da glutathione reduzida (GSH), um importante sistema antioxidante pulmonar. Outros estudos mostraram que em fumantes, bem como em animais cronicamente expostos à fumaça de cigarro, há aumentos da peroxidação lipídica, da carbonilação de proteínas, da oxidação de tióis e da oxidação do DNA (Frei et al., 1991; Park et al., 1998). Além disso, marcadores do estresse oxidativo e do dano ao DNA estão também significativamente elevados em portadores de DPOC (Ceylan et al., 2006). Elevadas concentrações de agentes oxidantes no pulmão diminuem a capacidade antioxidante, o que contribui para o dano às células, favorecendo ainda mais a resposta inflamatória (Comhair e Erzurum, 2002; Valença e Porto, 2008; Menegali et al., 2009; Aydin et al., 2015).

A inflamação é um processo biológico complexo que ocorre em resposta a estímulos nocivos e cuja função é eliminar a causa da lesão celular e iniciar o processo de reparação. O processo inflamatório dos pulmões com DPOC é regulado por um mecanismo complexo envolvendo diferentes células e mediadores inflamatórios (Chung e Adcock, 2008). Importante observar que, além da inflamação presente nas vias aéreas, há também evidências de inflamação sistêmica (Gan et al, 2005; Wouters, 2005).

Fumantes sem a DPOC apresentam uma resposta inflamatória discreta uma reação de defesa da mucosa à inalação crônica de irritantes, entretanto, em indivíduos que desenvolvem a DPOC, ocorre um aumento da resposta inflamatória, que se acentua com a progressão da doença (Kanazawa e Yoshikawa, 2005; Barnes, 2009). A inflamação crônica inicia-se pela ativação e influxo de várias células inflamatórias e secreção de mediadores inflamatórios no pulmão, incluindo citocinas, quimiocinas, enzimas inflamatórias, receptores e moléculas de adesão, que são reguladas por fatores de transcrição genética (Barnes et al., 2003; MacNee, 2005).

Nesse processo inflamatório existe a participação não apenas das células inflamatórias, mas de células estruturais como epiteliais, musculares e fibroblastos (Barnes, 2008; Kim et al., 2008). A indução de quimiocinas e citocinas em células epiteliais de pulmão por fumaça de cigarro é principalmente regulada por vias de sinalização redox sensíveis (Mossman et al., 2006).

O hábito de fumar ativa macrófagos, que conseqüentemente produzem mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases (Cosio et al., 2009; Tuder e Petrache, 2012). As citocinas atuam em células-alvo e podem desempenhar muitas funções: ativação e proliferação celular, quimiotaxia de outras células, imunomodulação, liberação de outras citocinas ou mediadores inflamatórios, favorecer o crescimento e a diferenciação celulares, além de apoptose (Chung e Barnes, 1999). Mediadores importantes produzidos por macrófagos e neutrófilos incluem fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina (IL) -1, IL-6 e IL-8. Além do envolvimento dos sistemas imune inato e adquirido na resposta inflamatória, parece haver um desequilíbrio dos mecanismos de controle da inflamação na patogênese da DPOC (Cosio et al., 2009). Observa-se que em pacientes com DPOC, a inflamação pulmonar crônica é acompanhada pela indução de respostas imunes que contribuem para infecções respiratórias intermitentes, agravando o microambiente pulmonar inflamatório e a gravidade da doença (Lee et al., 2011; Rovina et al., 2013).

1.1.7 O inflamassoma

Considerando o efeito da inflamação local e sistêmica associada ao tabagismo, fortes evidências têm apontado para o papel crucial do complexo Inflamassoma caspase-1 sobre a inflamação neutrofílica

pulmonar associada à fumaça de cigarro ou em relacionada à DPOC (Eltom et al., 2014). A resposta imune inata depende de receptores de reconhecimento padrão (PRR) para direcionar resposta à micróbios patogênicos e outros patógenos endógenos ou exógenos. Os PRRs são expressos principalmente em células imunes e inflamatórias, como monócitos, macrófagos e neutrófilos (Schroder e Tschopp, 2010; Fullard e O'Reilly, 2005).

Um PRR recentemente identificado, descrito pela primeira vez em detalhes em 2002, é o Inflamassoma (Martinon et al., 2002; Gentile et al., 2015; Sanders et al., 2015). O Inflamassoma é um termo derivado da palavra, “inflamação” unida ou sufixo “somo”, que significa corpo, e refere-se a uma plataforma de interação de diversas proteínas que formam um complexo (Zoete et al., 2014). Numerosos inflamassomas foram identificados como importantes plataformas de controle de infecções, no entanto, os de proteínas receptoras do tipo NOD (NLRP3) é o mais estudado até hoje, e está associado com a patogênese de doenças autoimunes, inflamatórias, neurodegenerativas, dentre outras (Eigenbrod e Dalpke, 2015).

Através da ativação direta por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs,) ou indiretamente via padrões moleculares associados a danos (DAMPs), os receptores do tipo NOD (NLRs) detectam a presença de infecções bacterianas, fúngicas, parasitárias e virais, possibilitando a erradicação e controle dos microorganismos. Entretanto, a ativação excessiva do inflamassoma pode se tornar prejudicial ao hospedeiro, gerando um quadro de imunopatologia que pode causar complicações (Martinon et al., 2002; Broz e Dixit, 2016).

O inflamassoma é um complexo multiproteico intracelular que atua na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (Caspases) como uma estrutura essencial para a regulação da imunidade em condições fisiológicas e no reconhecimento de sinais de perigo a diferentes componentes. Sua formação é desencadeada por várias substâncias produzidas durante as infecções, danos aos tecidos ou durante os desequilíbrios metabólicos. São plataformas chave de sinalização, que ativam as citocinas altamente pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-18 (Martinon et al., 2002; Kawai e Akira, 2011; Miao et al., 2011).

A importância da ativação dessas citocinas está amplamente relacionada com a ocorrência do processo inflamatório, já que, através das mesmas, ocorre a liberação de outros fatores pró-inflamatórios, resultando na manutenção desse processo, e consequente reparo

tecidual. A resposta inflamatória crônica apresenta o envolvimento de citocinas, como IL-1 β e IL-18, entretanto, necessitam de um processo pós-transcricional para se estabelecerem na sua forma ativa, isto é, dependem de uma clivagem exercida pela enzima caspase-1 para tornarem-se maduras e exercerem suas funções (Thornberry et al., 1992). Da mesma forma, a ativação da caspase-1 é dependente da clivagem proteolítica, que também ocorre no Inflamassoma. Esse complexo é constituído por uma proteína receptora da família NLRPs, (família NLR, proteínas contendo domínio pirina), localizada no citosol, que serve como uma plataforma para a sua formação; uma proteína adaptadora, (proteína speck-like associada à apoptose com domínio de recrutamento de caspase) ASC que é semelhante a partícula apoptótica contendo CARD (domínio efetor de recrutamento de caspases) e uma proteína efetora chamada caspase-1.

A formação do inflamassoma facilita a autoclivagem e a ativação da caspase-1, a qual cliva proteoliticamente as citocinas pró-IL-1 β e pró-IL-18 nas suas formas maduras, o que finalmente favorece as respostas pró-inflamatórias e anti-microbianas (Martinon et al., 2002). O Inflammasoma NLRP3 está presente principalmente em células imunes e inflamatórias após sua ativação; como macrófagos, monócitos, células dendríticas, e neutrófilos (Zhong et al., 2013). Na literatura são descritos três mecanismos diferentes que resultam na ativação do inflamassoma NLRP3: os efluxos de Ca⁺² intracelular relacionados ao retículo endoplasmático (Shenderov et al., 2014). A ativação de PAMPs e DAMPs que desencadeiam a geração de EROs, que por sua vez induz a ativação do inflamassoma NLRP3. E por fim, a ativação por irritantes ambientais, como os estímulos cristalinos da sílica, que é um dos fatores desencadeantes da secreção de IL-1 β . Porém, o meio de ativação desse receptor ainda é controverso. Sabe-se que não acontece de modo direto justamente pela grande quantidade de substâncias que podem desencadear sua formação (Lawlor e Vince, 2014; Rajanbabu et al., 2015).

Embora a sua ativação seja essencial para a defesa contra patógenos, a sua regulação inadequada pode afetar negativamente o equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, somado a isso, recentemente foi demonstrado que a ativação desse complexo está envolvida na patogênese de várias doenças com componente inflamatório, incluindo condições crônicas periféricas, como o diabetes do tipo 2, e doenças do SNC, como a doença de Parkinson e de

Alzheimer (Halle et al., 2008; Siniscalco et al., 2012; Jamilloux e Henry, 2013).

A atividade da caspase -1 e a produção de citocinas como IL-1 β e a IL-18 tem sido reportada estar aumentada em amostras pulmonares de modelos de fumaça de cigarro (Kang et al., 2007; Eltom et al., 2014). A fumaça de cigarro parece ativar inflamassoma NLRP3, considerada sua via canônica de ativação, como demonstrado na Figura 2. Camundongos expostos à fumaça de cigarro, e pacientes com DPOC, apresentam ASC extracelular no lavado broncoalveolar sugerindo a sua participação nas doenças inflamatórias crônicas (Kratzer et al., 2013; Franklin et al., 2014). Outros estudos demonstram a ação do inflamassoma no mecanismo deletério no sistema respiratório, no entanto, ainda não está claro seu papel sistêmico, tampouco músculo esquelético (Eltom et al., 2014).

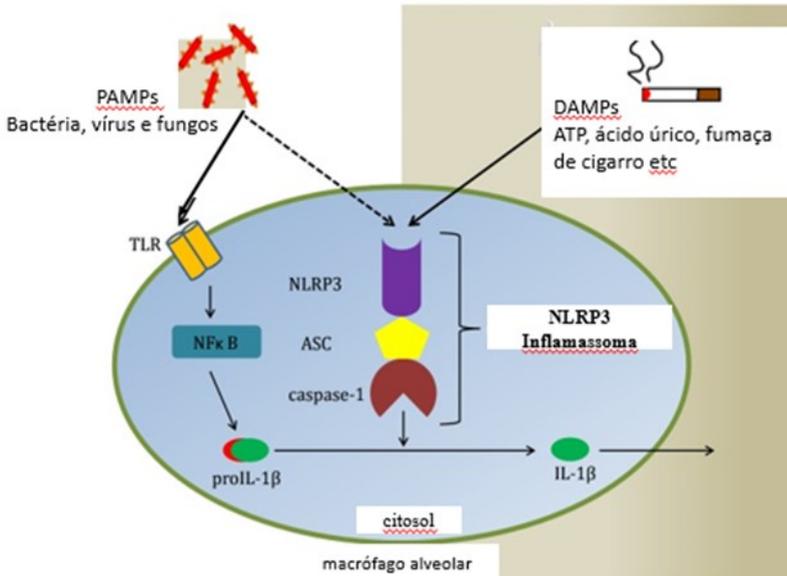


Figura 2: Fumaça cigarro como ativador do inflamassoma NLRP3. Dois tipos diferentes de estímulos são capazes de ativar o inflamassoma, padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), por um lado, e danificar os padrões moleculares associados (DAMPs) no outro. Para a ativação inflamatória, dois sinais distintos são necessários. Somente a partir daí a PRO IL-1 β é clivada pela caspase-1, de modo que a IL-1 β madura pode ser segregada por macrófagos e promover a resposta inflamatória. Fonte: Article in PLoS ONE June 2013.

No processo de reabilitação de indivíduos com DPOC, há evidências de que o exercício físico modula positivamente tais vias oxidativas e inflamatórias no processo de disfunção cardiopulmonar e músculo esquelética. Adicionalmente, poucos estudos demonstram que o exercício associado a qualquer outro tipo de terapia, pode aumentar significativamente a capacidade física e a qualidade de vida desses pacientes, agindo positivamente sobre o quadro de disfunção muscular (Cooper, 2001; McCarthy et al., 2015).

1.1.8 Exercício físico na função muscular

O exercício físico tem sido amplamente utilizado a fim de otimizar a capacidade física de pacientes portadores de disfunções cardiorrespiratórias e músculo esqueléticas associadas ao cigarro (Pinho et al., 2007). É bem estabelecido, portanto, que o exercício físico em suas diferentes formas, têm efeito cardioprotetor (Frederico et al., 2009; Hassel et al., 2014; Peeri e Amiri, 2015) e antioxidante, e tem sido usado como recurso terapêutico adjuvante em diversas doenças crônico-degenerativas (Pinho et al., 2007, Menegali et al., 2009, Silva et al., 2009).

Porém, a intolerância ao exercício é uma manifestação comum em pacientes com DPOC. Este fato já foi atribuído exclusivamente ao distúrbio respiratório que esses indivíduos apresentam; entretanto, atualmente tem-se verificado que a disfunção muscular esquelética periférica é um fator importante para a diminuição da capacidade para realização de exercícios nessa população (Maltais et al., 1996; Gosselink et al., 2000; Debigaré et al., 2001). Uma prescrição apropriada de exercícios físicos pode contribuir para a redução da dispneia, da astenia e adaptações periféricas, especialmente melhorando a função muscular na DPOC (McCarthy et al., 2015). Neste contexto, o exercício físico é considerado fundamental na reabilitação pulmonar e, dentre os tipos de exercício, o treinamento aeróbio pode ser efetivo na reversão dos prejuízos funcionais (Cooper, 2001; Spruit et al., 2002).

O exercício aeróbio é recomendado para indivíduos com DPOC, visto que estudos demonstram melhora na capacidade respiratória, na concentração de enzimas oxidativas e mitocondriais, assim como a capilarização dos músculos treinados entre outros fatores, resultando em maior condicionamento cardiovascular, tolerância ao exercício e menor dispnéia (Silva e Dourado, 2008; Van Wessel et al., 2010). Segundo Puhon et al. (2005), o treinamento de força é importante no processo de

reabilitação, visto que o aumento da força muscular periférica resulta em melhora significativa da capacidade funcional de exercício, evidenciada por incrementos da distância percorrida em testes de caminhada e do aumento do tempo de endurance (Clark et al., 2000; Normandim et al., 2002; Ortega et al., 2002; Wright et al., 2002).

Conforme Dourado e Godoy (2004), os componentes mais efetivos da reabilitação pulmonar são aqueles relacionados à atividade física como os exercícios aeróbios, os exercícios resistidos periféricos e respiratórios. Além disso, a associação destas duas modalidades, caracterizada pelo exercício combinado, também é alvo dos mesmos objetivos, somando exercícios de endurance (aeróbio) e força (anaeróbio) que são adequados para o aumento da resistência e força muscular, respectivamente.

O treino aeróbio consiste na realização de exercícios em esteiras e bicicletas com baixa intensidade e longo tempo, e o treino de força inclui exercícios com peso/carga elevadas e baixas repetições de movimento (Langer et al., 2009). O primeiro está associado ao aumento da aptidão cardiorrespiratória e também muscular com provável aumento nos valores de consumo máximo de oxigênio (VO_2 Máx), dependendo da intensidade, já o segundo está associado à melhora da capacidade de gerar força máxima (Willians et al., 2002).

As respostas adaptativas ao exercício físico decorrem em parte do estresse fisiológico/metabólico associado ao esforço cuja magnitude depende de vários fatores, isto é, apresenta heterogeneidade quanto ao tipo, intensidade e duração, portanto, seus efeitos dependem do tipo de exercício a ser utilizado (Garber et al., 2011). Estudo recente de nosso grupo demonstrou que o exercício físico é eficaz na prevenção da resposta oxidativa pulmonar em ratos expostos à fumaça de cigarro (Nesi et al., 2016), e também pode atuar na resposta inflamatória (Horsburgh et al., 2015). O exercício físico de intensidades leve a moderado, realizado regularmente, é recomendado para a manutenção da saúde e prevenção de inúmeras doenças. Também reduz a produção de oxidantes e a ocorrência de danos oxidativos, melhorando o sistema de defesa antioxidante e aumentando a resistência dos órgãos e tecidos contra a ação deletéria dos RL (Alessio e Goldfarb, 1988; Polidori et al., 2000; Pinho et al., 2006).

Diferentes tipos de treinamento vêm sendo investigados, como a associação do exercício de endurance e de força, buscando atenuar o enfraquecimento muscular geral que acomete o indivíduo com DPOC e

também o fumante sem a doença, porém os resultados ainda permanecem inconsistentes (Tromm et al., 2015).

1.2 JUSTIFICATIVA

Atualmente o consumo do CP tem aumentado entre a população, difundido como sendo um produto “artesanal, natural, livre de produtos tóxicos” o que poderia sugerir aos consumidores a falsa ideia de que são inofensivos a saúde. Devido a isso, a preocupação com seus possíveis efeitos bioquímicos/moleculares e mecanismos de lesão no sistema respiratório e músculo esquelético vêm crescendo, e gerando diversas perguntas à comunidade científica.

Vários estudos têm demonstrado que as anormalidades na musculatura esquelética são manifestações comumente encontradas em fumantes, levando a redução da capacidade ao exercício, perda de qualidade de vida e alta mortalidade (Barnes 2014, Gea et al., 2015). Os efeitos do exercício físico em geral já estão bem estabelecidos na disfunção respiratória e muscular relacionado ao uso do cigarro industrializado. Entretanto, em relação a outra forma de consumo do tabaco, como ao cigarro de palha, ainda existem muitas perguntas acerca dos seus efeitos biológicos, e quanto às implicações do exercício físico sobre uma possível disfunção músculo esquelética associada a esse tipo de cigarro especialmente.

Portanto, se os efeitos de adaptação da musculatura esquelética exposta ao exercício forem considerados, espera-se que um fumante que pratica a exercício físico se beneficie dessas adaptações, pelo menos preservando sua massa muscular. Existem também, fortes evidências apontando sobre o papel crucial do complexo inflamassoma caspase-1 sobre a inflamação neutrofílica pulmonar na DPOC, o que está altamente relacionado ao uso do cigarro.

As respostas para estas questões podem trazer importantes avanços no entendimento dos mecanismos associados ao papel do complexo inflamassoma NLRP3 quando exposto à fumaça de cigarro de palha, assim como, sobre os efeitos do exercício físico combinado no possível processo de atrofia muscular decorrentes dessa exposição. Neste sentido, adotar estratégias de exercício físico que comprovadamente reduzem os efeitos nocivos do consumo do cigarro de palha sobre a função músculo esquelética, podem contribuir com a saúde da população.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do exercício físico combinado (exercício físico aeróbio associado ao exercício de força) na resposta músculo esquelética frente à exposição crônica à fumaça de CP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o influxo de leucócitos no conteúdo de lavado broncoalveolar (LBA) dos camundongos submetidos ao exercício combinado e expostos à inalação da fumaça do CP.
- Avaliar o dano em DNA sistêmico dos camundongos submetidos ao exercício combinado e expostos à inalação da fumaça do CP.
- Avaliar o efeito do exercício combinado sobre a resposta oxidativa, DCF, SOD, Nitrito, ONOO na resposta músculo esquelética de camundongos expostos à fumaça de CP.
- Avaliar o efeito do exercício combinado sobre o sistema glutathiona, GSH, GSSG e a razão GSH/GSSG na resposta músculo esquelética de camundongos expostos à fumaça de CP.
- Avaliar mediadores inflamatórios Myf5, TGF- β e MPO na resposta músculo esquelética de camundongos expostos à fumaça de CP.
- Identificar o perfil histopatológico do tecido muscular esquelético de camundongos expostos à fumaça de CP.
- Avaliar o efeito do exercício combinado sobre os mediadores do complexo inflamassoma, ASC, e caspase-1 clivada, na resposta músculo esquelética de camundongos expostos à fumaça de CP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

A presente proposta foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, sob o protocolo número 087/2015-1. Todos os experimentos respeitaram estritamente os princípios éticos da experimentação animal em conformidade com as diretrizes brasileiras para uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, P.7).

3.2 ANIMAIS

Para atender a demanda proposta no projeto foram utilizados 48 camundongos Swiss de 60 dias de idade, pesando entre 30-50 gramas, agrupados e gaiolas específicas fornecidos pelo Biotério da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram mantidos em ciclos de claro-escuro de 12/12 horas a uma temperatura de 22 ± 1 °C, tendo livre acesso à água e alimentação padrão para roedores *ad libitum*. Os animais foram divididos randomicamente em 4 grupos com n=8 para as análises bioquímicas e moleculares e n=4 para histologia, totalizando n=12 por grupo: 1- ar ambiente sedentário, 2- sedentário + fumaça de CP, 3- exercício combinado + ar ambiente, 4- exercício combinado + fumaça de CP.

3.3 PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO

Todos os CP foram confeccionados artesanalmente e tiveram o peso de 8 gramas, equivalente ao cigarro comercial (Malboro vermelho). Seguindo um protocolo previamente estabelecido, os animais foram expostos passivamente à inalação de fumaça de 12 cigarros de palha por dia, sendo 4 cigarros de palha por sessão, 3 sessões por dia (turnos manhã, tarde e noite), durante 7 dias por semana e o tempo de exposição foi de 30 dias consecutivos para todos os grupos experimentais. Os animais foram alocados em uma câmara de inalação de acrílico (com dimensões de 40cm x 30cm por 25cm de altura), que ficou dentro de uma capela de exaustão durante todo o processo de inalação. Os cigarros foram acoplados à uma seringa de plástico de 60 ml para captação da

fumaça e assim imediatamente injetada para dentro da caixa acrílica com os animais. A partir da injeção de fumaça para o interior da caixa, a exposição à fumaça de cigarro teve duração de 6 minutos com a tampa da caixa acrílica fechada, ao final deste tempo, a tampa foi removida, e o exaustor da capela ligado para eliminação da fumaça por 1 minuto seguido de uma nova exposição à queima do cigarro até totalizar os 4 cigarros de cada sessão. Os animais do grupo controle permaneceram na caixa inalatória durante o período experimental, porém expostos somente ao ar ambiente (Valença et al., 2006). Durante a exposição à fumaça, as concentrações de CO foram medidas pelo analisador de gases de combustão Optma 7. O equipamento analisa as concentrações de monóxido de carbono de 0 (zero) a 4.000 (quatro mil) ppm.

Para a análise, foi introduzida uma sonda de 40 cm de comprimento na lateral da caixa hermética. Optou-se por este posicionamento da sonda, porque em testes previamente realizados não foram constatadas diferenças nas concentrações de CO em diferentes posições. A mensuração foi realizada em 3 momentos durante a exposição, obteve-se a média de 670ppm.

3.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

O protocolo de treinamento foi constituído da associação de 30 minutos de treino de esteira somados a 30 minutos de treino de força. O período de treinamento foi de 4 semanas e a frequência de treinamento foi de 3 a 4 dias por semana, com intervalos de 48 horas entre as sessões. Para o treinamento de esteira os animais foram inicialmente adaptados previamente durante uma semana (10m/min, 0.6km/h, sem inclinação durante 10min/dia) todos os dias da semana, para reduzir o estresse do ambiente. Cada sessão foi constituída por 30 minutos de duração sem inclinação, com velocidade média de 13m/min a 17m/min. Os animais não receberam nenhum estímulo para correr. As sessões do treino de força foram de 30 min em um aparato de 12 graus com 80% de inclinação. A intensidade de esforço foi progressiva usando um peso acoplado à cauda do animal de 25% a 75% da massa corporal. Cada sessão foi constituída de 3 a 5 séries com 2 min de intervalo entre as séries e cada série teve de 8 a 12 repetições sem intervalo. A combinação do exercício aeróbio (esteira) e o de força seguiu um protocolo já publicado (Souza et al., 2016).

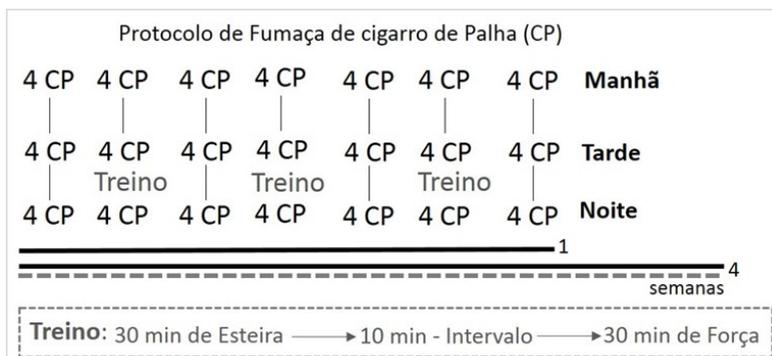


Figura 3: Esquema representativo do protocolo experimental. A figura representa o desenho experimental, onde CP significa fumaça de cigarro de palha e os demais símbolos (linha contínua preta e pontilhada cinza) se referem às linhas do tempo dos protocolos, os quais serão aplicados concomitantemente durante 4 semanas. A linha contínua refere-se à exposição à fumaça de CP e a pontilhada ao tempo de treinamento.

3.5 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

3.5.1 Lavabo broncoalveolar (LBA)

Após 48 horas da última exposição ao protocolo de inalação de fumaça de cigarro e da sessão de exercício, todos os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Os animais foram submetidos ao procedimento de lavado broncoalveolar (LBA). A traquéia foi exposta cirurgicamente e injetado 1 mL de soro fisiológico com seringa apropriada para lavar o pulmão. Imediatamente após a injeção o fluido foi aspirado e armazenado em gelo para contagem total de células (câmara de Neubauer) e demais análises. O procedimento e aspiração do fluido foi realizado 3 vezes, com velocidade constante para impedir a lesão de estruturas. Após o procedimento de LBA, a porção central do músculo quadríceps foi retirada por dissecação e preparado para posteriores análises. As amostras foram imediatamente processadas, alíquotadas e armazenadas a -70° para análises bioquímicas. O quadríceps de 4 animais em cada grupo foi submerso em solução de paraformaldeído 4% para posterior processamento histológico. O descarte dos animais foi feito do acondicionamento em saco branco leitoso e armazenados em freezer -40 para posterior

tratamento e deposição final em aterro sanitário, conforme procedimentos estabelecidos pela Vigilância Sanitária (RDC 306/2004).

3.5.2 Contagem de leucócito total na câmara de Neubauer

Este protocolo constou da contagem total de leucócitos em LBA utilizando a câmara de Neubauer. As células nucleadas foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara de Neubauer, cujo volume total é de $0,4 \text{ mm}^3$. Amostras com elevada celularidade, pode-se realizar uma diluição em solução aquosa de fucsina 0,2% na proporção (1:20). Essa solução otimiza a contagem, sobretudo por corar o núcleo das células nucleadas e por provocar lise dos eritrócitos, os quais, dependendo da quantidade, dificultam a contagem (Comar et al., 2011).

3.5.3 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado em amostras de sangue coletadas sob condições alcalinas e o dano em DNA de células individuais foi quantificado para análises de dano em DNA (Singh et al., 1988).

3.6 ENSAIOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES

3.6.1 Análises bioquímicas

Os níveis de espécies reativas foram mensurados com base na oxidação da sonda 2',7'- diclorodihidrofluoresceína acetato (DCF-DA) em um composto fluorescente 2',7'- diclorodihidrofluoresceína (DCF), como previamente descrito (Hempel et al., 1999). A amostra foi incubada com DCF-DA 80 mM a 37°C durante 15 minutos. A DCF-DA é desesterificada no interior das células por esterases endógenas para o ácido livre ionizado, DCFH. DCFH é oxidado em DCF pelas espécies reativas. A formação deste derivado oxidado fluorescente foi monitorada com os comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente. A produção de espécies reativas foi quantificada utilizando uma curva padrão de DCF e os dados foram expressos como mol DCF/mg de proteína.

Os níveis de GSH foram determinados por meio do ensaio fluorimétrico descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas modificações. Este ensaio baseia-se no princípio de que os grupos tióis

(-SH) da GSH reagem especificamente com orto-ftalaldeído (OPT) (em pH 8,0), resultando na produção de um produto altamente fluorescente.

A atividade da enzima SOD foi estimada através da inibição da auto-oxidação da adrenalina e lida em um comprimento de onda de 480 nm (McCord e Fridovicj, 1969).

A atividade da MPO foi avaliada através da adição de HTBA e TMB sobre a amostra de quadriceps. O substrato foi lido em leitor de Elisa a 650 nm (Kuebler et al., 1996). A quantidade de nitrito em amostras de homogeneizado de quadriceps foi estimada através da reação da sulfanilamida com o ácido fosfórico acrescido de naftilenodiamido diclorídrico. Após descanso de 10 min na estufa as amostras foram lidas em leitor de placa a 550 nm (Giovannoni, 1997).

3.6.2 Método de ELISA

Foi avaliada a produção de TGF- β por método de imuno ensaio mediante utilização do kit de ELISA conforme recomendação do fabricante (R&D systems®, USA e ALPCO®, USA, Labtest®, Brazil).

3.6.3 Análise por Western Blotting

As proteínas foram desnaturadas em aquecimento com tampão contendo 100mM DTT. Após isto, 0.2 mg do extrato de proteína obtido de cada tecido foi separado por SDS-PAGE, transferido para uma membrana de PVDF que foi incubada com anticorpos da via do complexo inflamassoma, (anti-ASC, anti-CASPASE-1), marcador de peroxinitrito ONOO⁻ (anti nitrotirosina) e da via de reparo tecidual (anti-Myf5). Todos os anticorpos foram obtidos das empresas Abcam ou Santa Cruz (Santa Cruz Biotecnologias, CA, USA). A detecção quimioluminescente foi realizada com anticorpos secundários conjugados a peroxidases. Visualização das proteínas foi realizada pela exposição das membranas ao raio-x (Kodak XAR, Rochester, NY). Depois de transferidas, as membranas foram coradas e quantificadas por corante de ponceau, para controle da transferência. As proteínas foram reveladas em filmes radiográficos e a intensidade das bandas foram detectadas por densitometria óptica usando um software de imagem (Scion Corporation) (Oliveira et al., 2014).

3.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Para análise histológica foram coletadas amostras do músculo quadríceps (área da porção central do músculo quadríceps em geral) de cada animal, que foram embebidos em solução fixadora de paraformaldeído tamponado a 10% por 48 horas para posterior processamento e corte de lâminas histológicas com 4-5 μm de espessura. As lâminas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (H&E), para posterior avaliação em microscopia de luz, utilizando o sistema de captura em microscópio invertido NIKON ECLIPSE Ti-U. Foram realizadas a quantificação da área da fibra e a quantificação do núcleo central, como análise de morfologia muscular, ambas análises foram realizadas por método estereológico (Stewart et al., 2016).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos na determinação dos parâmetros bioquímicos, moleculares e morfológicos foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) two-way, seguido pelo teste post hoc Newman-Keuls. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $p < 0,05$. Para a análise do ensaio cometa, os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) de 1 via -Tukey. Considerando os grupos estatisticamente diferentes quando o valor de p for $\leq 0,05$. (* Diferença significativa em relação ao grupo controle, #Diferença significativa em relação ao grupo exercício combinado e fumaça de CP + exercício combinado, $p < 0,05$, ANOVA 1 via -Tukey). Para todas as análises, foi utilizado o graph-pad prisma versão 5.0.

4 RESULTADOS

Figura 4.

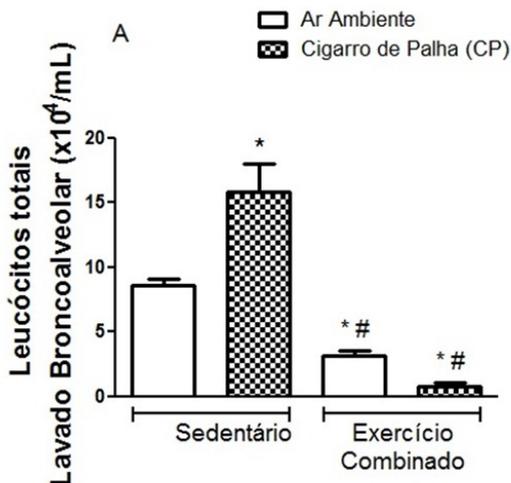


Figura 4: Contagem total de leucócitos em amostras de de LBA de camundongos expostos cronicamente à fumaça do cigarro de palha. Os dados obtidos estão expressos em média e erro padrão da média e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) two-way, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Considerando os grupos estatisticamente diferentes quando o valor de p for $\leq 0,05$. (* diferença estatística em relação ao grupo ar ambiente sedentário, # diferença estatística em relação ao CP sedentário.

A Fig.4 apresentou aumento significativo do número de leucócitos totais no conteúdo de LBA no grupo CP sedentário em relação ao sedentário ar ambiente. Houve uma redução significativa de leucócitos no grupo exercício combinado exposto à CP quando comparado ao grupo exercício combinado ar ambiente. Adicionalmente, nossos dados demonstraram que o exercício combinado foi capaz de diminuir significativamente os leucócitos no grupo CP em relação ao grupo CP sedentário.

Figura 5 (A-B).

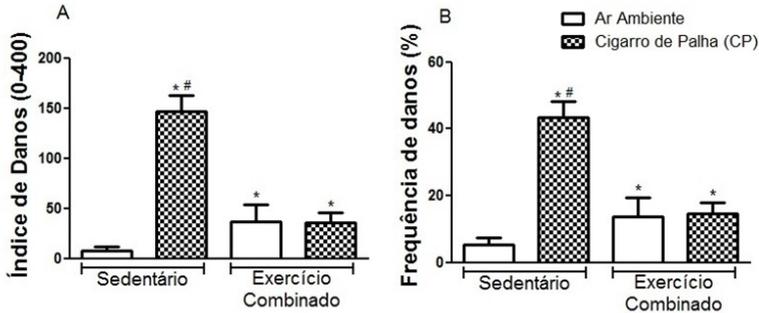


Figura 5 (A-B): Dano em DNA de amostras de sangue de camundongos expostos cronicamente à fumaça do cigarro de palha. A- dados referentes ao índice de dano e B- frequência de dano, ambos analisados pelo ensaio cometa. Os dados obtidos estão expressos em média e erro padrão da média e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) de 1 via -Tukey. Considerando os grupos estatisticamente diferentes quando o valor de p for $\leq 0,05$. (* Diferença significativa em relação ao grupo controle, #Diferença significativa em relação ao grupo exercício combinado e fumaça de CP + exercício combinado, $p < 0,05$, ANOVA 1 via -Tukey).

Foram analisados, índice de frequência (Fig. 5A) e índice de dano em DNA (Fig. 5B), por ensaio cometa. Os resultados demonstraram um aumento significativo tanto da frequência quanto do índice de dano em DNA no grupo sedentário + CP em comparação aos demais grupos. Já os grupos, exercício combinado + ar ambiente e exercício combinado + CP apresentaram uma diminuição significativa, ambos comparados ao grupo sedentário+ ar ambiente.

Figura 6 (A-B).

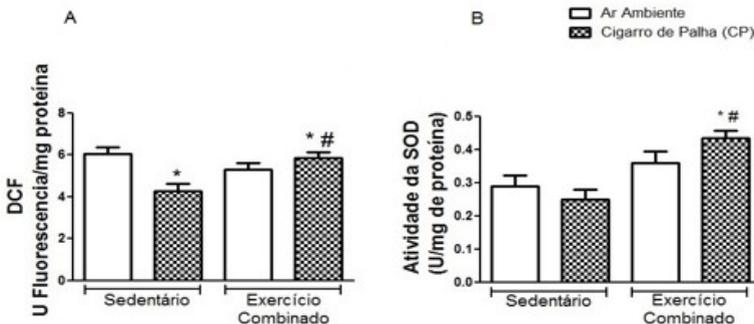


Figura 6 (C-D)

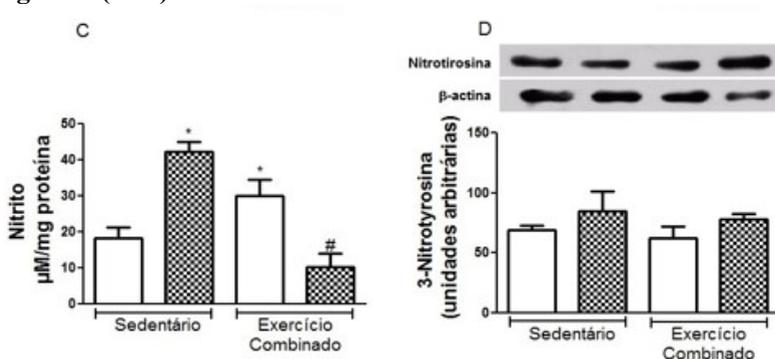


Figura 6 (A-D): Capacidade oxidativa e resposta nitrativa em amostras de homogeneizado de quadríceps de camundongos expostos cronicamente à fumaça do CP. A. Quantificação de capacidade oxidativa através do DCF em homogeneizado de quadríceps. B. Atividade da SOD por método colorimétrico. C. Quantificação de nitrito pelo método de Griess em homogeneizado de quadríceps. D. Imagem representativa do conteúdo de 3-nitrotirosina (ONOO⁻) normalizado pela β -actina, por método de western blotting (n=3). Os dados obtidos estão expressos em média e erro padrão da média e quantificados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) two-way, seguido pelo post hoc de Newman-Keuls. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes com valor de $p \leq 0,05$, onde * significa diferença estatística em relação ao grupo ar ambiente sedentário e # indica diferença estatística em relação ao CP sedentário.

Na Fig. 6A, foi observado uma diminuição significativa dos níveis de DCF no grupo exposto a fumaça de CP quando comparado ao sedentário + ar ambiente. O grupo exercício combinado não apresentou diferença estatística quando comparado ao sedentário + ar ambiente ou sedentário + CP. E um aumento do DCF no grupo exercício combinado + CP em comparação aos grupos; sedentário + ar ambiente e sedentário + CP respectivamente. O sistema de defesa antioxidante tem o objetivo primordial de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, em relação a atividade da enzima antioxidante SOD, na Fig. 6B, nossos dados demonstram a atividade da SOD significativamente aumentada no grupo exercício combinado +CP em comparação ao grupo sedentário + ar ambiente e sedentário + CP. Na Fig. 6D o nitrito, um produto da oxidação do óxido nítrico (ON), teve seus níveis aumentados significativamente pela exposição a fumaça de CP em relação ao sedentário + ar ambiente. Entretanto no grupo

exercício combinado + CP, os níveis de nitrito estão significativamente menores em relação ao grupo CP sedentário. A Fig. 6D observa-se uma tendência ao aumento do conteúdo de 3-nitrotirosina, marcador indireto de ONOO-, no grupo sedentário + CP quando comparado ao grupo exercício combinado + CP.

Figura 7 (A-C).

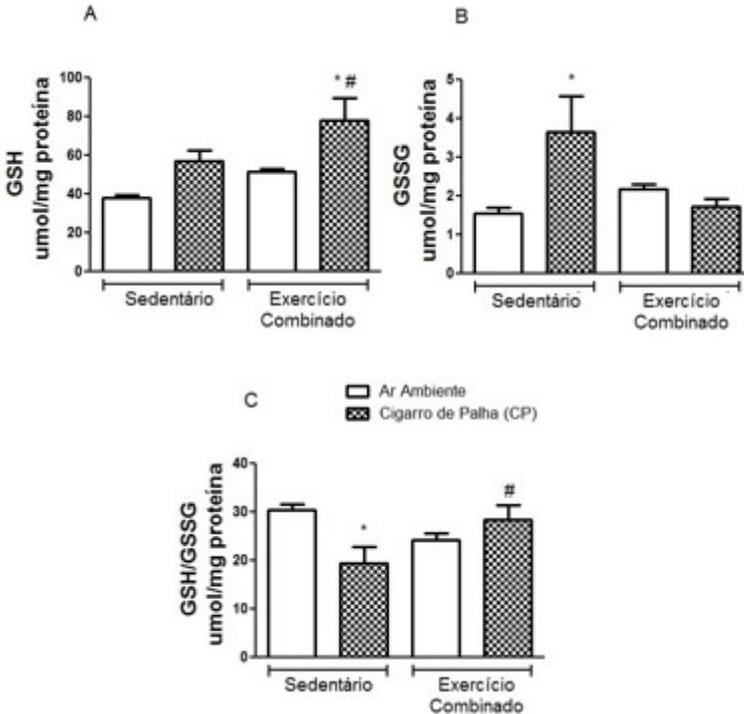


Figura 7 (A-C): Atividade do sistema glutatona em amostras de homogeneizado de quadriceps de camundongos expostos cronicamente à fumaça do CP. A. Atividade de GSH, B. atividade de GSSG e C. a razão entre GSH/GSSG por método colorimétrico. Os dados obtidos estão expressos em média e erro padrão da média e quantificados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) two-way, seguido pelo post hoc de Newman-Keuls. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes com valor de $p \leq 0,05$, onde * significa diferença estatística em relação ao grupo ar ambiente sedentário e # indica diferença estatística em relação ao CP sedentário.

Na Fig. 7A, o conteúdo de GSH, uma das principais enzimas do sistema glutatona apresentou aumento significativo no grupo exercício combinado + CP quando comparado aos grupos sedentários. Já a GSSH, Fig. 7B, apresentou-se aumentada somente no grupo sedentário + CP quando comparado ao sedentário + ar ambiente, não apresentando diferença significativa nos demais grupos. Por fim, na Fig. 7C, a razão GSH/GSSG apresentou-se diminuída no grupo sedentário + CP em comparação ao sedentário + ar ambiente e aumentada no grupo exercício combinado + CP em comparação ao sedentário + CP.

Figura 8 (A-C).

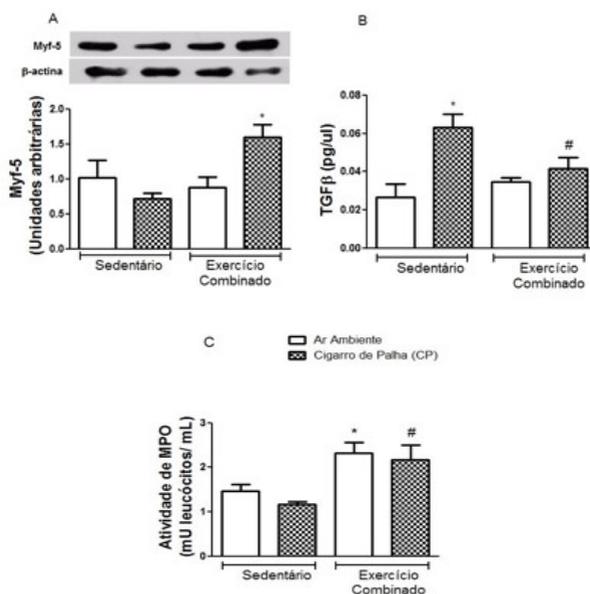
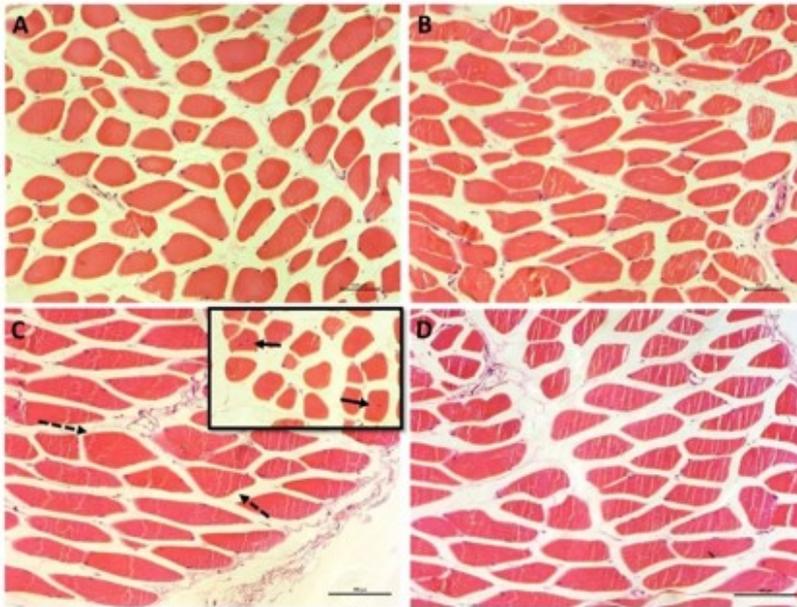


Figura 8 (A-C): Marcadores de inflamação e regeneração muscular em amostras de homogeneizado de quadriceps de camundongos expostos cronicamente à fumaça do CP. A. Conteúdo de Myf5 normalizada pela β -actina em imagens representativas de western blotting. B. Produção de TGF- β pelo método de ELISA em homogeneizado de quadriceps. C. Atividade da MPO por método colorimétrico. Os dados obtidos estão expressos em média e erro padrão da média e quantificados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) two-way, seguido pelo post hoc de Newman-Keuls. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes com valor de $p \leq 0,05$, onde * significa diferença estatística em relação ao grupo ar ambiente sedentário e # indica diferença estatística em relação ao CP sedentário.

Como apresentado na Fig. 8A, o fator miogênico Myf5 foi aumentado significativamente no grupo exercício combinado + CP em relação ao grupo sedentário + ar ambiente, os demais grupos não obtiveram diferença estatística. Na Fig. 8B. Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), proteína que controla a proliferação, diferenciação celular e outras funções na maioria das células, apresentou-se aumentado no grupo exposto à fumaça de CP comparado ao sedentário + ar ambiente. Entretanto, o grupo que foi exposto ao exercício combinado + CP apresentou diminuição significativa dos níveis de TGF- β em relação ao grupo de animais sedentários CP. A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima liberada principalmente por neutrófilos ativados, caracterizada pela sua propriedade pró-oxidativa e pró-inflamatória; na Fig. 8C, nossos resultados demonstram um aumento significativo da MPO nos grupos de animais expostos ao exercício combinado quando comparados aos seus respectivos controles, sedentário + ar ambiente e sedentário + CP, respectivamente.

Figura 9 (A-F).



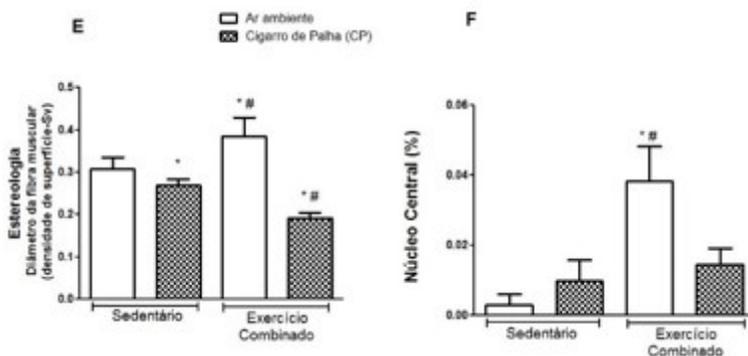


Figura 9 (A-F): Dados morfológicos do tecido muscular de quadríceps de camundongos expostos cronicamente à fumaça do CP. Na fig. 9 (A-D), fotomicrografias do músculo quadríceps corados em coloração de hematoxilina e eosina, apresentadas na seguinte ordem dos grupos: (A) sedentário, (B) sedentário + CP, (C) exercício combinado, evidenciando aumento da fibra muscular na seta pontilhada e núcleo central na seta preta contínua, (D) exercício combinado + CP. O gráfico (E) representa a quantificação do diâmetro da fibra muscular de quadríceps por cálculos estereológicos (densidade de superfície – Sv); (F) representa os dados de porcentagem de centralização de núcleo nos respectivos grupos. Os dados obtidos estão expressos em média e erro padrão da média e quantificados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) two-way, seguido pelo post hoc de Newman-Keuls. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes com valor de $p \leq 0,05$, onde * significa diferença estatística em relação ao grupo ar ambiente sedentário e # indica diferença estatística em relação ao CP sedentário. Imagens em objetiva de 20x.

Na Fig. 9 (A-F), imagens representativas de cortes histológicos transversais do músculo quadríceps de animais expostos à fumaça de CP corados com coloração de (H&E) foram mostrados. Na Fig. 9A, o grupo sedentário + ar ambiente apresentou morfologia das fibras musculares de aspecto normal com núcleo periférico. Na imagem do grupo fumaça de CP na Fig. 9B, foi possível observar poucas fibras musculares com núcleos centralizados e ainda uma diminuição da área da fibra. Na Fig. 9C, o grupo exercício combinado apresentou aumento da área da fibra muscular (seta pontilhada) e presença de núcleo centralizado na histoarquitetura do tecido no detalhe a direita da imagem evidenciado pela seta contínua. Na morfometria, na Fig. 9D houve uma diminuição da área da fibra com poucas regiões de núcleo central. Na Fig. 9E o grupo CP apresentou diminuição do diâmetro da fibra muscular

comparado ao sedentário + ar ambiente. O grupo exercício combinado aumentou o diâmetro da fibra em comparação ao sedentário + ar ambiente e o sedentário + CP. Adicionalmente, o grupo exercício combinado + CP apresentou diminuição significativa do diâmetro da fibra muscular em comparação ao sedentário + ar ambiente e o CP. Na Fig. 9F não apresentou diferença entre os grupos sedentários. Somente o exercício combinado apresentou aumento significativo da porcentagem de núcleo centralizado quando comparado com os grupos; sedentário + ar ambiente e sedentário + CP.

Figura 10 (A-B).

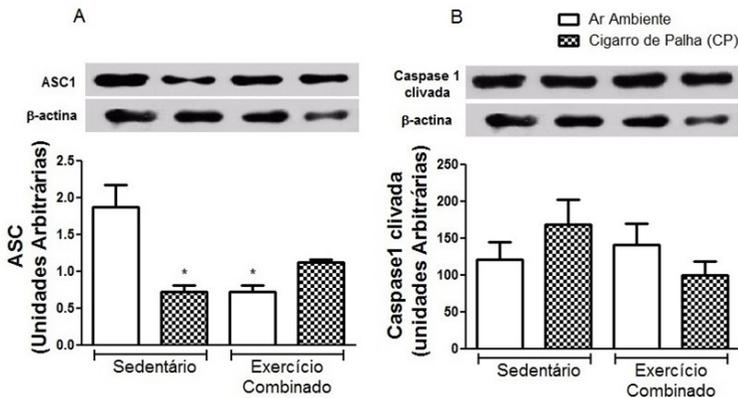


Figura 10 (A-B): Imagens representativas do conteúdo de ASC e caspase-1 em amostras de homogeneizado de quadríceps de camundongos expostos cronicamente à fumaça do cigarro de palha. (A) Conteúdo de ASC e (B) caspase-1, ambas normalizadas pela β -actina em imagens representativas de western blotting (n=3). As fotos das bandas são representativas para o resultado. Os dados obtidos estão expressos em média e erro padrão da média e quantificados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) two-way, seguido pelo post hoc de Newman-Keuls. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes com valor de $p \leq 0,05$, onde * significa diferença estatística em relação ao grupo ar ambiente sedentário e # indica diferença estatística em relação ao CP sedentário.

O conteúdo da ASC na Fig. 10A apresentou diminuição significativa nos grupos sedentário + CP e no grupo exercício combinado + ar ambiente quando comparados ao sedentário + ar ambiente. Na Fig. 10B houve uma tendência ao aumento relativo à caspase 1 clivada, no grupo sedentário + CP em relação aos demais grupos, entretanto, sem diferença estatística.

5 DISCUSSÃO

Durante décadas, os efeitos da fumaça de cigarro industrializado sobre o sistema biológico foram alvo de diversos grupos de pesquisa. Os constituintes químicos do cigarro industrializado podem causar alteração na estrutura celular e no perfil redox pulmonar, além de contribuir para demais alterações no sistema músculo esquelético e em vários órgãos (Gochman et al., 2007, Menegali et al., 2009; Aydın et al., 2015).

Outras formas de tabaco podem induzir danos ao nosso organismo. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais essas substâncias podem induzir tais alterações. O aumento no consumo do CP gerou intensa preocupação devido aos seus possíveis efeitos bioquímicos e moleculares sobre o sistema respiratório e músculo esquelético. A literatura demonstra que esse tipo de cigarro pode aumentar o desenvolvimento de bronquite crônica e câncer de cavidade oral (Menezes, 1997; Niel, 2008). Dados preliminares do nosso grupo demonstram que o CP pode levar a alterações no epitélio respiratório e contribuir para o dano oxidativo pulmonar e músculo esquelético (Camera et al., 2016). Novas terapias não farmacológicas como o exercício físico, têm sido aplicadas para minimizar a disfunção respiratória e muscular relacionado aos efeitos do cigarro. A inflamação sistêmica e o estresse oxidativo são importantes mecanismos de lesão envolvidos na resposta celular neste contexto, induzindo efeitos nocivos independentes sobre os pulmões e o sistema músculo esquelético (Cielen et al., 2015). Nos pulmões, sabe-se que há um forte aumento na quimiotaxia de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, para o interstício pulmonar (Kenedi-Feitosa et al., 2014). Nossos dados reforçam essa informação, demonstrando que o CP também pode induzir tal influxo de leucócitos no LBA.

O exercício físico aeróbio tem efeito antioxidante e anti-inflamatório em resposta a fumaça de cigarro industrial, de forma preventiva ou terapêutica (Nesi et al., 2016, Menegali, 2009). O exercício combinado associa exercícios aeróbios e de força. A modalidade aeróbia é recomendada para indivíduos com DPOC, pois induz aumento na concentração de enzimas oxidativas e mitocondriais, melhorando a capacidade ao exercício (Tromm et al., 2015). Por outro lado, a modalidade de força é indicada a esses pacientes, em virtude da fraqueza muscular relacionada à intolerância ao exercício (Da Luz et al., 2011). Nosso modelo demonstrou que o exercício combinado pode diminuir a resposta leucocitária no pulmão, reforçando estudos

anteriores que mostraram que o exercício aeróbio melhora a resposta inflamatória induzida por cigarro em amostras de LBA (Toledo et al., 2012). Portanto, o exercício combinado demonstrou ser eficaz sobre o controle da inflamação pulmonar em nosso modelo.

A inflamação como mecanismo de defesa natural atua contra uma variedade de fatores nocivos, como infecções, doenças crônicas e tabagismo, estão relacionados ao aumento da produção de radicais livres ocasionando a oxidação de proteínas, lipídios e DNA, pulmonar e sistêmico (Salzano et al., 2014, Zang et al., 2011). Estudos indicam que a ineficiência do reparo do DNA é comum em pacientes com DPOC e está relacionado com a susceptibilidade ao desenvolvimento e progressão da doença (Neofytou et al., 2012). O dano em DNA está ainda associado ao mecanismo de atrofia muscular também presente no paciente com DPOC e em condições de hipóxia (Deldicque et al, 2013). Dependendo da intensidade e do volume do treinamento, o exercício físico pode modular o dano em DNA.

Recentemente foi descrito que o exercício regular de baixa à média intensidade evitou a instabilidade do DNA diminuindo o dano (Danese et al., 2017). Nossos dados corroboram com tais achados, uma vez que o a fumaça de CP induziu aumento do dano em DNA em amostras de sangue e o exercício combinado atenuou essa condição, atuando de forma eficiente sobre o reparo do dano em DNA. Esse dano é comumente associado com o estresse oxidativo, e o reparo de DNA recorrente, ligados à condição de hipóxia, podem esgotar a capacidade regenerativa das células satélites em pacientes com DPOC, contribuindo para disfunção músculo esquelética (Deldicque et al, 2013). A disfunção muscular, presente nos pacientes com DPOC, tem se manifestado, dentre outras formas, pelo déficit da força muscular periférica, acometendo a musculatura dos membros inferiores e, mais especificamente, o músculo quadríceps femoral (Miranda et al., 2011). A fumaça de cigarro pode induzir uma intensa resposta oxidativa muscular (Carlos et al., 2014).

Embora dados demonstrem que a fumaça de cigarro industrial aumente enzimas antioxidantes como a SOD em músculo esquelético (Barreiro et al., 2012), nossos dados demonstram que o CP pode atuar de forma distinta sobre a resposta oxidativa muscular, demonstrando uma diminuição da SOD e um regulação positiva da resposta nitrativa, pelo aumento de nitrito no quadríceps.

Dentre os constituintes da fumaça de cigarro, altas concentrações de ERO e de radical ON são encontrados (Nakayamma et al., 1989).

Acreditamos que o CP pode aumentar a produção de ON e assim, favorecer o desvio da via oxidativa para uma via nitrativa, o que explica o aumento do DCF e diminuição de nitrito nessa condição. O ON está associado a várias sinalizações em processos fisiológicos e patológicos, no entanto, em excesso também aumenta a geração de ERO e ERN, principalmente na condição de DPOC. Esse excesso de ON pode reagir com o superóxido formando peroxinitrito (ONOO^-), uma ERN que pode causar danos às macromoléculas em células musculares (Reid, 2001; Collins et al., 2012), tal achado corrobora com nossos dados.

Por outro lado, a contração muscular resulta em um aumento da produção de ON através de uma maior expressão de óxido nítrico sintase (nONs), o que aumenta o fluxo sanguíneo devido à vasodilatação e aumenta indiretamente a defesa antioxidante muscular durante o exercício (Reid, 2001; Collins et al., 2012) O mecanismo específico pelos quais as enzimas nNOs regulam a hipertrofia, tipo de fibra, resistência, resistência à fadiga e microtúbulos, ainda é incerto. Até o presente momento, existem possíveis mecanismos que podem permitir que o nNOS regule vários processos fisiológicos no músculo esquelético (Moon Y et al., 2017). Um desses mecanismos sugere que os músculos glicolíticos apresentem maior expressão de nNos do que os músculos oxidativos (Kobzik et al., 1994). Tanto em indivíduos fumantes como em modelos experimentais de fumaça de cigarro, é observado uma diminuição das fibras musculares oxidativas com predominância das fibras glicolíticas (Montes et al., 2008, De Paepe et al., 2008, Gosker et al., 2009, Rinaldi et al., 2012), sugerindo que tal tipo de fibra poderia favorecer uma resposta nitrativa estimulada pela fumaça de cigarro.

Nossos dados corroboram com essa hipótese, visto que apresentam aumento de nitrito em tecido muscular exposto ao CP, sugerindo que esse tipo de cigarro também poderia induzir tal mecanismo. Essa via tem sido amplamente estudada em músculos expostos a fumaça de cigarro, sugerindo que altos níveis de estresse oxidativo e nitrativo promovem a disfunção músculo esquelética, caracterizada pelo processo de atrofia por regulação de proteólise muscular (Rom et al., 2012, Sukhanov et al., 2011).

Como adaptação ao exercício físico, há um aumento da capacidade antioxidante e essa resposta é extremamente dependente da intensidade do treinamento (Garber et al., 2011). O exercício combinado em nosso modelo, otimizou a capacidade antioxidante no músculo, aumentando a atividade da SOD e da razão GSH/GSSG além de diminuir a resposta nitrativa induzida pelo CP, sugerindo que esse tipo

de exercício é capaz de modular a resposta nitrativa por uma regulação positiva da via oxidativa no músculo esquelético.

A fumaça de cigarro demonstra modificações irreversíveis da glutathiona no epitélio da via aérea. No músculo, os resultados demonstram que a fumaça de cigarro industrial diminui a atividade do sistema glutathiona (Ardite et al., 2005). Nossos dados corroboram com a literatura, mostrando que o CP também pode diminuir a razão GSH/GSSG. Adicionalmente, o exercício combinado teve a capacidade de aumentar a resposta do sistema glutathiona de forma efetiva, mesmo sob o estímulo da fumaça de CP.

Em músculo esquelético, a resposta aguda ao estresse envolve a síntese de proteínas de manutenção da estrutura e homeostase celular. A proliferação celular presente na regeneração do tecido, também requer aumento da síntese de proteínas, e a manutenção do equilíbrio entre síntese e degradação proteica, o que pode ser regulado pela resposta antioxidante. Como um dos principais mecanismos de controle da degradação proteica, o estresse oxidativo tem o papel de impedir a fosforilação da AKT, liberando o fator de transcrição FoxO que favorece a indução de genes pró atroficos (Caron et al., 2013).

O fator de transcrição de elemento de resposta antioxidante, NRF2 é um mecanismo alternativo de resposta antioxidante que pode regular o estresse oxidativo, principalmente por aumentar GSH e demais sistemas de defesa que contribuem muito para o processo de regeneração muscular (Al-Sawaf et al., 2014).

Nossos dados estão de acordo com esse achado, demonstrando que o CP diminuiu a atividade do sistema glutathiona e que o exercício combinado, como resposta adaptativa apresentou um aumento desse sistema em presença de CP. Tais achados reforçam a ideia de que esse tipo de exercício pode reorganizar o perfil bioquímico muscular em nosso modelo.

Embora, haja essa reorganização do estresse oxidativo muscular, não avaliamos os possíveis danos bioquímicos para compreender essa resposta. Entretanto, observamos em nossos dados que a morfologia muscular sofreu intensas alterações, mostrando que o CP pode alterar a resposta muscular nos animais expostos ao ar ambiente e ainda impedir o aumento de diâmetro muscular induzido pelo exercício combinado. Já foi mostrado que a exposição de fumaça de cigarro durante 15 dias apresentou resultado semelhante ao nosso, sugerindo modelo crônico para elucidar tais vias. Nosso trabalho confirmou tal hipótese com modelo de 30 dias de fumaça de CP apresentando o mesmo resultado na

alteração morfológica. De forma geral, a hipertrofia é uma importante adaptação muscular ao exercício físico, o que resulta na amplificação do número de elementos contráteis em paralelo ao aumento máximo de tensão que o músculo pode produzir (Camargo et al., 2011)

Quando exposto a fumaça de cigarro, o músculo apresenta maior tendência a processos de atrofia, como uma resposta adaptativa a hipóxia muscular. Em situações de pouco suprimento de oxigênio no corpo, o tecido muscular responde com adaptações histológicas como a atrofia da fibra muscular e fagocitose (Dubowitz, 2007). Esses aspectos foram encontrados em nossos dados, mostrando que o CP também pode gerar tal diminuição do diâmetro da fibra muscular, assim já é demonstrado em diversos trabalhos científicos com o cigarro industrializado (Caron et al., 2013). Níveis elevados de CO, como observado na queima do CP, promove aumento da CoHb periférica (Melo et al., 2005; Torres, 2009; Jardim et al. 2010), a qual interfere diretamente na transferência de oxigênio para os tecidos e leva a hipoxemia em diferentes órgãos (Varisco, 2004).

Nessas condições há uma diminuição da diferenciação muscular, em parte, pela inibição da expressão do Myf5, evitando que os precursores musculares se tornem fibras musculares pós-mitóticas (Di Carlo et al., 2004). Apesar de estar presente somente por alguns dias durante o desenvolvimento embrionário, a Myf5 ainda é expressa em certas células satélites adultas (Beauchamp, 2000), portanto, pode estar presente em fibras musculares que passaram por processo de regeneração. Especificamente, permitindo um breve impulso de proliferação dessas CS em resposta a lesões. Em acordo com esses resultados, nossos dados demonstram uma diminuição do conteúdo de Myf5 no músculo exposto a fumaça de CP, sugerindo que esse tipo de cigarro pode limitar a diferenciação muscular. Interessantemente, o exercício combinado somado à fumaça de CP demonstrou aumento da Myf5, sugerindo melhora do perfil de regeneração muscular. Nossos dados demonstraram um aumento da secreção de TGF β , importante marcador de remodelamento, nos animais expostos a fumaça de CP e àqueles do grupo exercício combinado e CP apresentaram uma diminuição dessa resposta.

O tecido muscular exposto a fumaça de cigarro apresenta adaptações inflamatórias e oxidativas com objetivo de regular o equilíbrio entre a síntese e a degradação proteica para manutenção de homeostase. Em resposta a processos de redução de massa muscular em doenças crônicas, citocinas incluindo o TGF β , induzem o sistema Ubp,

que reduz a massa muscular pelo aumento da degradação proteica contribuindo para o quadro de disfunção muscular (Waning et al., 2015).

Estudos tem mostrado que o TGF β é um fator importante na indução de fraqueza muscular no contexto da caquexia via NADPH oxidase Nox4 (Waning et al., 2015).

Nesse contexto, áreas transversais das fibras glicolíticas tipo II apresentam-se substancialmente reduzidas (Li et al., 2007), tais respostas refletem uma susceptibilidade diferencial de tipo de fibra à inatividade física, bem como aumento de citocinas próinflamatórias, hipóxia e estresse oxidativo nessa condição (Ciciliot et al., 2014). Nossos dados estão de acordo com tais achados, demonstrando um aumento da secreção de TGF β e uma diminuição do diâmetro da fibra muscular em resposta a exposição ao CP.

Surpreendentemente, em resposta a esse mecanismo, o exercício combinado com fumaça de CP apresentou uma diminuição de TGF β acompanhado de uma redução do diâmetro muscular. Um estudo mostrou uma redução dos níveis sistêmicos de TGF- β após exercício em pacientes com DPOC, corroborando com nossos resultados e sugerindo que essa resposta seja mediada pela inflamação via TNF- α (Chiang, et al., 2014). Outro estudo mostrou que o inflamassoma NLRP3 pode induzir a produção de colágeno, principalmente via IL-1 β , ativado por caspase-1 em músculo liso (Hughes et al., 2017). Visto a grande limitação de estudos sobre o mecanismo do inflamassoma no músculo esquelético e que suportem nossa hipótese, é de suma importância a associação de dados que possam elucidar tal via. Mesmo com aumento de MPO no grupo exercício combinado e fumaça de CP, evidenciando uma intensa resposta leucocitária, não foi suficiente para modular ou estimular o processo de hipertrofia muscular em resposta ao exercício. Houve portanto, uma diminuição de massa muscular indicada pela redução de diâmetro da fibra incluindo a redução da secreção de TGF β muscular, importante indutor de colágeno, ambos, induzidos pelo exercício em presença de CP. Sugerimos ainda que esse mecanismo adaptativo do exercício combinado pode modular negativamente o inflamassoma NLRP3, indicado pela diminuição de ASC em nosso modelo, visto que o conteúdo de caspase-1 clivada não demonstrou diferença significativa em nossos dados. Dados suportam nossos achados, demonstrando que o exercício físico pode diminuir a ativação de inflamassoma em modelo de depressão (Martins, et al., 2016), entretanto na resposta muscular ainda é pouco explorado tal mecanismo. Além disso, vários estudos têm demonstrado que as anormalidades

musculares são manifestações comumente encontradas em fumantes, levando a redução da capacidade ao exercício (Barnes 2014, Gea et al., 2015). Entretanto esses estudos referem-se ao uso de cigarro industrializado e nosso estudo foi um dos primeiros a investigar o possível efeito do CP neste contexto, e se o exercício físico na modalidade combinado poderia contribuir para minimizar ou evitar essas alterações no músculo esquelético quando associado á esse tipo de cigarro.

6 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, a resposta muscular no modelo de fumaça de CP parece ser dependente da intensidade do exercício. Acreditamos que nosso modelo de exercício combinado foi capaz de aumentar o diâmetro da fibra muscular para os animais expostos ao ar ambiente, porém na condição de fumaça de CP, com as alterações metabólicas e oxidativas geradas por esse estímulo nocivo, o exercício sob influência do CP, foi incapaz de exercer seu papel estrutural sobre o tecido muscular e tampouco de regeneração. Assim, mesmo com aumento na resposta antioxidante, o CP impediu que o exercício modulasse positivamente a morfologia da fibra muscular, demonstrando que em condições de fumaça de CP, considerada quadro de hipóxia, a intensidade e tipo de exercício tem papel chave sobre a capacidade de regeneração e hipertrofia muscular.

REFERÊNCIAS

- Achutti AC, Rosito MH, Achutti VA. Tabagismo. In: Duncan BB, Schmidt MI, Giugliani ER. Medicina ambulatorial: condutas de atenção primária baseadas em evidências. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.
- Agustí AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003;21(2):347-60.
- Al-Sawaf O, Fragoulis A, Rosen C, Keimes N, Liehn EA, Hölzle F, et al. Nrf2 augments skeletal muscle regeneration after ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2014;234(4):538-47.
- Alessio HM, Goldfarb AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. *J Appl Physiol*. 1988;64(4):1333-6.
- Almeida TS, de Andrade RM, de Gois JS, Borges DLG. Development of a simple and fast ultrasound-assisted extraction method for trace element determination in tobacco samples using ICP-MS. *Inter. J. Environ. Anal. Chem*. 2014;94 (8):756-764.
- Appell HI. Muscular atrophy following immobilization: a review. *Sports Med*. 1990;10:42-58.
- Ardite E, Peinado VI, Rabinovich RA, Fernández-Checa JC, Roca J, Barberà JA. Systemic effects of cigarette smoke exposure in the guinea pig. *Respir Med*. 2006 Jul;100(7):1186-94.
- Associação Brasileira dos Fumicultores do Brasil (BR). AFUBRA, 2016. Disponível em: <http://www.afubra.com.br>
- Aydin S, Ogeturk M, Kuloglu T, Kavakli A, Aydin S. Effect of carnosine supplementation on apoptosis and irisin, total oxidant and antioxidants levels in the serum, liver and lung tissues in rats exposed to formaldehyde inhalation. *Peptides*. 2015;64:14-23.
- Barnes PJ e Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009;33:1165e85.
- Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *Clinics in chest medicine*. 2014;35(1): xiii.
- Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:183-92.
- Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003;22(4):672-88.

Barreiro E, Peinado VI, Galdiz JB, Ferrer E, Marin-Corral J, Sánchez F, et al. Cigarette smoke-induced oxidative stress: A role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182(4): 477-88.

Barreiro E, del Puerto-Nevaldo L, Puig-Vilanova E, Pérez-Rial S, Sánchez F, Martínez-Galán L, Rivera S, Gea J, González-Mangado N, Peces-Barba G. Cigarette smoke-induced oxidative stress in skeletal muscles of mice. *Respir Physiol Neurobiol.* 2012; 182(1): 9-17.

Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, et al. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Biol.* 2000. v. 151, n.6, p. 1221-1234.

Bernard K, Krause KH. The NOX family of ROS generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007; 87(1):245-313.

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):1014-9.

Boonyarom O, Inui K. Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: structural and functional aspects. *Acta Physiol (Oxf).* 2006 Oct;188(2):77-89.

Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(7):407-20.

Caiozzo VJ, Haddad F, Baker MJ, Herrick RE, Prietto N, Baldwin KM. Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1996; 81(1): 123-132.

Camargo Filho JCS, Garcia BC, Kodama FY, Bonfim MR, Vanderlei LCM, Ramos EMC. Efeitos do exercício aeróbico no músculo esquelético de ratos expostos à fumaça de cigarro. *Rev Bras Med Esp.* 2011; 17(6): 416-19.

Camera FD. Caracterização química do cigarro de palha, dano tecidual e efeito nutracêutico da erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil.) no pulmão de camundongos expostos à fumaça do cigarro (tese de doutorado). Cricúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; 2016.

Carlos SP, Dias AS, Forgiarini Júnior LA, Patricio PD, Graciano T, Nesi RT, et al. Oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in mice: impact on lung tissue and diaphragm muscle. *J Bras Pneumol.* 2014; 40(4): 411-420.

Caron MA, Theriault ME, Pare MÈ, Maltais F, Debigare R. Hypoxia alters contractile protein homeostasis in L6 myotubes. *FEBS Lett.* 2009;583(9):1528-34.

Caron MA, Thériault ME, Paré ME, Maltais F, Debigaré R. Hypoxia alters contractile protein homeostasis in L6 myotubes. *FEBS Lett.* 2009; 583(9): 1528-34.

Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, Pinto Plata V, Cabral HJ. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 2004;350:1005–1012.

Centers for Disease Control and Prevention .CDC (US), Smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses: United States, 2000–2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008.

Centers for Disease Control and Prevention CDC (US), Health Effects - Smoking & Tobacco Use - Centers for Disease U.S. Department of Health and Human Services. *The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General.* Atlanta:2017.

Centers for Disease Control and Prevention; National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion; Office on Smoking and Health (US). *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking - Attributable Disease: A Report of the Surgeon General.* In: *Chemistry. Chemistry and Toxicology of Cigarette Smoke and Biomarkers of Exposure and Harm.* Atlanta (GA). 2010.

Ceylan E, Kocyigit A, Gencer M, et al. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass. *Respir Med.* 2006; 100: 1270–1276.

Chang NC, Rudnicki MA. Satellite cells: the architects of skeletal muscle. *Curr Top Dev Biol.* 2014;107:161-81.

Chiang CH, Chuang CH, Liu SL. Transforming growth factor- β 1 and tumor necrosis factor- α are associated with clinical severity and airflow limitation of COPD in an additive manner. *Lung.* 2014; 192(1): 95-102.

Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax.* 1999;54:825-57.

Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J*. 2008;31(6):1334-56.

Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Oct;45(10):2191-9.

Cielen N, Maes K, Heulens N, Maes K, Heulens N, Troosters T, Carmeliet G, Janssens W, Gayan-Ramirez GN. Interaction between physical activity and smoking on lung, muscle and bone in mice. 2015. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10.

Clark CJ, Cochrane LM, Mackay E, Panton B. Skeletal muscle strength and endurance in patients with mild COPD and the effects of weight training. *Eur Respir J*. 2000; 15: 92-7.

Clarke BA, Drujan D, Willis MS, et al. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab*. 2007;6:376-85.

Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*. 2000; 72(2):637-46.

Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, et al. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol*. 2009; 185: 1083-95.

Collins Y, Chouchani ET, James AM, Menger KE, Cochemé HM, Murphy MP. Mitochondrial redox signalling at a glance. *J Cell Sci*. 2012; 125(Pt 4): 801-6.

Comar S, Schulz T, Machado N, França F, Haa P. Cytological analysis of peritoneal fluid. *Estud Biol*. 2011;v. 32/33, p. 73-79.

Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 283(2): L246-55.

Cooper CB. Exercise in chronic obstructive pulmonary disease: limitations and rehabilitation. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33:S643-6.

Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2009 Jun 4;360(23):2445-54.

D'antona G, Lanfranconi F, Pellegrino A, Brocca L, Adami R, Rossi R, Moro G, Miotti D, Canepari M, Bottinelli R. Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibers in male body builders. *J Physiol*. 2006;1;570(Pt 3):611-27.

Danese E, Lippi G, Sanchis-Gomar F, Brocco G, Rizzo M, Banach M, et al. Physical Exercise and DNA Injury: Good or Evil? *Adv Clin Chem.* 2017; 81: 193-230.

De Paepe B, Brusselle GG, Maes T, Creus KK, D'hose S, D'Haese N, et al. TNF alpha receptor genotype influences smoking-induced muscle-fibre-type shift and atrophy in mice. *Acta Neuropathol.* 2008; 115(6): 675-81.

De Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 16;6(12):a016287.

Debigaré R, Côté CH, Maltais F. Peripheral muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease – Clinical relevance and mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1712-7.

Deldicque L, Francaux M. Acute vs. chronic hypoxia: What are the consequences for skeletal muscle mass? *Cell Mol Exerc Physiol.* 2013; 2(1): e5.

Deschenes MR, Giles JA, McCoy RW, Volek JS, Gomez AL, Kraemer WJ. Neural factors account for strength decrements observed after short-term muscle unloading. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;282(2):R578-83.

Dhawan J, Rando TA. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* 2005;15 (12):666–673.

Di Carlo A, De Mori R, Martelli F, Pompilio G, Capogrossi MC, Germani A. Hypoxia inhibits myogenic differentiation through accelerated myod degradation. *J. Biol. Chem.* 2004. 279, 16332–16338.

Dourado VZ, Godoy I. Muscle reconditioning in COPD: main interventions and new tendencies. *Rev Bras Med Espor.* 2004;10:335- 8. 27.

Duarte JL, de Faria FA, Ceolin DS, Cestari TM, de Assis GF. Effects of passive smoke inhalation on the vocal cords of rats. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006;72(2):210-6.

Dubowitz V, Sewry CA. *Muscle biopsy: a practical approach.* 3rd Ed. China: Saunders Elsevier; 2007.

Edgerton VR, Roy RR, Allen DL, Monti RJ. Adaptations in skeletal muscle disuse or decreased-use atrophy. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002;81(11 Suppl):S127-47.

Eigenbrod T, Dalpke AH. Bacterial RNA: an underestimated stimulus for innate immune responses. *J Immunol.* 2015;195:411–8.

Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, et al. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;1;182(5):693-718.

Elsayed NM e Bendich A. Elsayed NM e Bendich A. Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. *Nutrition Research.* 2001; 21 (3):551-16.

Eltom S, Belvisi MG, Stevenson CS, Maher SA, Dubuis E, Fitzgerald KA, Birrell MA. Role of the inflammasome-caspase1/11-IL-1/18 axis in cigarette smoke driven airway inflammation: an insight into the pathogenesis of COPD. *PloS one.* 2014;9(11): e112829.

Faucher M, Steinberg JG, Barbier D, Hug F, Jammes Y. Influence of chronic hypoxemia on peripheral muscle function and oxidative stress in humans. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2004;24(2):75-84.

Favier FB, Costes F, Defour A, Bonnefoy R, Lefai E, Baugé S, Peinnequin A, Benoit H, Freyssenet D. Downregulation of Akt/mammalian target of rapamycin pathway in skeletal muscle is associated with increased REDD1 expression in response to chronic hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298(6):R1659-66.

Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, Brenker C, Nordhoff M, Mirandola SR, Al-Amoudi A, Mangan MS, Zimmer S, Monks BG, Fricke M, Schmidt RE, Espevik T, Jones B, Jarnicki AG, Hansbro PM, Busto P, Marshak-Rothstein A, Hornemann S, Aguzzi A, Kastentmüller W, Latz E. The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation: *Nat Immunol.* 2014;15(8):727-37.

Frederico MJ, Justo SL, Da Luz G, Da Silva S, Medeiros C, Barbosa VA, Silva LA, Boeck CR, De Pinho RA, De Souza CT. Exercise training provides cardioprotection via a reduction in reactive oxygen species in rats submitted to myocardial infarction induced by isoproterenol. *Free Radic Res.* 2009 Oct;43(10):957-64.

Frei B, Forte TM, Ames BN, Cross CE. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid of ascorbic acid. *Biochem J.* 1991;277(Pt 1):133-8.

Fullard N, O'Reilly S. Role of innate immune system in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol.* 2015;37(5):511-7.

Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic

inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004;59(7):574-80.

Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee I, Nieman DC, Swain DP: Quantity and Quality of Exercise for Developing and Maintaining Cardiorespiratory, Musculoskeletal, and Neuromotor Fitness in Apparently Healthy Adults: Guidance for Prescribing Exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(7):1334-59.

Gea J, Pascual S, Casadevall C, Orozco-Levi M, Barreiro E. Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: update on causes and biological findings. *J Thorac Dis*. 2015;7(10):418-38.

Gentile LF, Cuenca AL, Cuenca AG, Nacionales DC, Ungaro R, Efron PA, Moldawer LL, Larson SD. Improved emergency myelopoiesis and survival in neonatal sepsis by caspase-1/11 ablation. *Immunology*. 2015;145(2):300-11.

Gerritsen WBM, Asin J, Zanen P, Van Den Bosch JMM, Haas FJLM. Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respir Med*. 2005;99(1):84-90.

Gimeno-Santos E, Frei A, Steurer-Stey C, de Batlle J, Rabinovich RA, Raste Y, Hopkinson NS, Polkey MI, van Remoortel H, Troosters T, Kulich K, Karlsson N, Puhon MA, Garcia-Aymerich J; PROactive consortium. Determinants and outcomes of physical activity in patients with COPD: a systematic review. *Thorax*. 2014;69:731-739.

Giovannoni G, Land J, Keir G, Thomphoson E, Heales S. Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. *Ann. Clin. Biochem*. 1997;34:193-198.

Giovino GA, Mirza SA, Samet JM, Gupta PC, Jarvis MJ, Bhala N, et al. Tobacco use in 3 billion individuals from 16 countries: an analysis of nationally representative cross-sectional household surveys. *Lancet*. 2012; 380(9842):668-79.

Glass DJ. Hipertrofia do músculo esquelético e vias de sinalização da atrofia. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37 (10):1974-1984.

Gochman E, Reznick AZ, Avizohar O, Ben-Amotz A, Levy Y. Exhaustive exercise modifies oxidative stress in smoking subjects. *Am J Med Sci*. 2007;(333)6: 346-8.

GOLD -Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Updated, 2016.

Gonzalez NC, Wood JG. Alveolar hypoxia-induced systemic inflammation: what low PO₂ does and does not do. *Adv Exp Med Bio.* 2010;662: 27–32.

Gosker HR, Langen RC, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG, Steele C, et al. Extrapulmonary manifestations of chronic obstructive pulmonary disease in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009; 40(6): 710-6.

Gosselink R, Troosters T, Decramer M. Distribution of muscle weakness in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *J Cardiopulm Rehabil.* 2000;20:353-60.

Haddad F, Roy RR, Zhong H, Edgerton VR, Baldwin KM. Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits. *J Appl Physiol.* 2003;95(2):791-802.

Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature immunology.* 2008; 9:857-865.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology Medicine* University Press, Oxford, NY. 1999.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 4. Oxford: Clarendon; 2007.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2): 231-55.

Hassel E, Berre A, Skjulsvik A, Steinshamn S. Effects of exercise training on pulmonary vessel muscularization and right ventricular function in an animal model of COPD. *Respir Res.* 2014; Sep 28;15:117.

Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91: 534–551, 2001.

Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 27:146-159, 1999.

Higashino K, Matsuura T, Suganuma K, Yukata K., Nishisho T, Yasui N. Early changes in muscle atrophy and muscle fiber type conversion after spinal cord transection and peripheral nerve transection in rats. *J Neuroeng Rehabil.* 2013;10:46.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74:214-226, 1976.

Holterman CE, Rudnicki MA. Molecular regulation of satellite cell function. *Seminars in Cell and Developmental Biology. Semin Cell Dev Biol.* 2005;16(4-5):575-84.

Hoppeler H, Vogt M. Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol.* 2001 Sep;204(Pt 18):3133-9.

Horsburgh S, Robson-Ansley P, Adams R, Smith C Exercise and inflammation-related epigenetic modifications: focus on DNA methylation. *Exerc Immunol Rev.* 2015; 21: 26–41.

Huang YC, Kuo YH, Huang YH, Chen CS, Ho DR, Shi CS. The Effects of Adipose-Derived Stem Cells in a Rat Model of Tobacco-Associated Erectile Dysfunction. *PLoS One.* 2016;3;11(6).

Hughes FM Jr, Sexton SJ, Jin H, Govada V, Purves JT. Bladder fibrosis during outlet obstruction is triggered through the NLRP3 inflammasome and the production of IL-1 β . *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017; ajpgrenal.00128.2017.

Instituto Nacional de Câncer (BR) O que é convenção-quadro para o controle do tabaco. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

Instituto Nacional de Câncer (BR). Comissão Nacional para Implementação da ConvençãoQuadro da Organização Mundial da Saúde para o Controle do Tabaco (Conicq) “Tabaco: uma ameaça ao desenvolvimento” Notas Técnicas para o Controle do Tabagismo. Rio de Janeiro:INCA, 2017.

Instituto Nacional de Câncer (BR). Organização Pan Americana da Saúde Pesquisa especial de tabagismo – PETab: relatório Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Organização Pan-Americana da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

Jackman RW, Kandarian SC. The Molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(4):C834 – C843.

Jagoe RT, Goldberg AL. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2001;4(3):183-90.

Jamilloux Y, Henry T. The inflammasomes: platforms of innate immunity. *Med Sci (Paris).* 2013;29(11):975-84.

Jardim JR, Bizeto L, Fleig Mayer A, Camelier A, Warken Rosa F, Oliveira D, Azevedo D, Hilário Saldiva P, Arruda Martins M, Bonassa J, Nascimento OA. An Inhalation Chamber Model for

Controlled Studies of Tobacco Smoke Toxicity in Rodents Arch Bronconeumol. 2010;46(9): 455-458.

Javadian S, Stigler-Granados P, Curtis C, Thompson F, Huber L, Novotny TE. Perspectives on Tobacco Product Waste: A Survey of Framework Convention Alliance Members' Knowledge, Attitudes, and Beliefs. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Aug 18;12(8):9683-91.

Kadi F, Eriksson A, Holmner S, Butler-Browne GS, Thornell LE. Cellular adaptation of the trapezius muscle in strength-trained athletes. *Histochem Cell Biol*. 1999;111:189–195.

Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, Charifi N, Madsen JL, Christensen LR, Andersen JL. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J Physiol*. 2004;558(Pt 3):1005-12.

Kadi F, Charifi N, Denis C, Lexell J, Andersen JL, Schjerling P, Olsen S, Kjaer M. The behaviour of satellite cells in response to exercise: what have we learned from human studies? *Pflugers Arch*. 2005;451(2):319-27.

Kanazawa H, Yoshikawa J. Elevated oxidative stress and reciprocal reduction of vascular endothelial growth factor levels with severity of COPD. *Chest*. 2005;128(5):3191-7.

Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2006;33(2):155-65.

Kandarian SC, Stevenson EJ. Molecular events in skeletal muscle during disuse atrophy. *Exerc Sport Sci Rev*. 2002;30(3):111-6. 10.

Kang MJ, Homer RJ, Gallo A, Lee CG, Crothers KA, Cho SJ, Rochester C, Cain H, Chupp G, Yoon HJ and Elias JA. IL-18 is induced and IL-18 receptor alpha plays a critical role in the pathogenesis of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema and inflammation. *Journal of immunology*. 2007;178(3): 1948-59.

Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011;34:637–650.

Kennedy-Feitosa E, Pinto RF, Pires KM, Monteiro AP, Machado MN, Santos JC, et al. The influence of 5-lipoxygenase on cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840(1): 199-208.

Kim V, Rogers TJ, Criner GJ. New concepts in the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 May 1;5(4):478-85.

Kuebler WM, Abels C, Schuerer L, Goetz AE. Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 1996;16, 89–97.

Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature.* 1994; 372(6506): 546-8.

Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr.* 2003; 16(4):433-41.

Kratzer A, Salys J, Nold-Petry C, Cool C, Zamora M, Bowler R, Koczulla AR, Janciauskiene S, Edwards MG, Dinarello CA and Taraseviciene-Stewart L. Role of IL-18 in second-hand smoke-induced emphysema. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2013;48(6): 725-32.

Kumar V, Abbas AB, Aster JC. Robbins & Cotran Patologia. Bases Patológicas das Doenças, 9a edição, Elsevier, 2016.

Langer D, Probst VS, Pitta F, Burtin C, Hendriks E, Schans CPVD, et al. Clinical Practice Guideline for physical therapy in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) - Portuguese version. *Rev Bras Fisioter.* 2009;13(3):183-204.

Lawlor KE, Vince JE. Ambiguities in NLRP3 inflammasome regulation: is there a role for mitochondria? *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(4): 1433–1440.

Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res.* 2012;91:142–149.

Léger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Dériaz O, Crettenand A, Gobelet C, Rohmer P, Konzelmann M, Luthi F, Russell AP. Akt signaling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol.* 2006;576(Pt 3):923-33.

Li H, Miao W, Ma J., Xv Z, Bo H, Li J, et al. Acute exercise-induced mitochondrial stress triggers an inflammatory response in the Myocardium via NLRP3 inflammasome activation with mitophagy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016;e1987149. 10.1155/2016/1987149.

Li P, Waters RE, Redfern SI, Zhang M, Mao L, Annex BH, Yan Z. Oxidative phenotype protects myofibers from pathological insults induced by chronic heart failure in mice. *Am J Pathol.* 2007; 170: 599-608.

MacNee W. Oxidants and COPD. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4(6):627-41.

Maltais F, Decramer M, Casaburi R, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update on limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014; 189: e15–e62.

Maltais F, Simard A, Simard C, Jobin J, Desgagnés P, Leblanc P. Oxidative capacity of the skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:288- 93.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell*. 2002;10(2): 417-26.

Martins RP, Lim C, Ghisoni K, Staas A, et al. Treating depression with exercise: The inflammasome inhibition perspective. *J Syst Integr Neurosci*. 2016; 3(1): 1-8.

Mathur S, Brooks D, Carvalho CR. Structural alterations of skeletal muscle in copd. *Front Physiol*. 2014; Mar 19;5:104.

McCarthy B, Casey D, Devane D, Murphy K, Murphy E, Lacasse Y. Pulmonary rehabilitation for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;2:Cd003793.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocytuprein (hemocytuprein). *J Biol Chem*. 1969 Nov 25;244(22):6049–6055.

Meirelles, RHS. Tabagismo e DPOC – dependência e doença – fato consumado. Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro. Pulmão RJ - Atualizações Temáticas. 2009; v. 1;13-19.

Menegali BT, Nesi RT, Souza PS, Silva LA, Silveira PC, Valença SS, Pinho RA. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. *Pulm Pharmacol Ther*. 2009;22(6):567-73.

Menezes AMB. Epidemiologia da bronquite crônica e do enfisema (DPOC): até onde sabemos? *J Bras Pneumol*. 1997;23(3):153-157.

Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol. Rev*. 2011;243:206–214.

Michael K. Relationship of skeletal muscle atrophy to functional status: a systematic research review. *Biol Res Nurs*. 2000;2(2):117-31.

Ministério da Saúde (BR), Instituto Nacional do Câncer. Tabagismo: Perguntas e Respostas. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2006.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico.– Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

Montes de Oca M, Loeb E, Torres SH, De Sanctis J, Hernández N, Tálamo C. Peripheral muscle alterations in non-COPD smokers. *Chest*. 2008; 133(1): 13-8.

Moon Y, Balke JE, Madorma D, Siegel MP, Knowels G, Brouckaert P, et al. Nitric Oxide Regulates Skeletal Muscle Fatigue, Fiber Type, Microtubule Organization, and Mitochondrial ATP Synthesis Efficiency Through cGMP-Dependent Mechanisms. *Antioxid Redox Signal*. 2017; 26(17): 966-985.

Mossman BT, Lounsbury KM, Reddy SP. Oxidants and signaling by mitogen-activated protein kinases in lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;34(6):666-9.

Murray A.J. Metabolic adaptation of skeletal muscle to high altitude hypoxia: how new technologies could resolve the controversies. *Genome Med*. 2009;1:117.

Nader, G.A. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37: (10)1985-96.

Nakayama T, Church DF, Pryor WA. Quantitative analysis of the hydrogen peroxide formed in aqueous cigarette tar extracts. *Free Radic Biol Med*. 1989; 7(1): 9-15.

Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Ishihara A. Effects of exposure to cigarette smoke at different dose levels on extensor digitorum longus muscle fibres in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30:671-7.

Neofytou E, Tzortzaki EG, Chatziantoniou A, Siafakas NM. DNA Damage Due to Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Int J Mol Sci*. 2012; 13(12): 16853–16864.

Nesi RT, de Souza PS, Dos Santos GP, Thirupathi A, Menegali BT, Silveira PC, da Silva LA, Valença SS, Pinho RA. Physical exercise is effective in preventing cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response in mice. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;22;11:603-10.

Niel M. Drogas e Redução de Danos: uma cartilha para profissionais de saúde/Redução de Danos para Drogas Fumadas. São Paulo, 2008.xi, 149f. Programa de Orientação e Atendimento a

Dependentes (PROAD). Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Ministério da Saúde, 2008.

Normandim EA, McCusker C, Connors M, Vale F, Gerardi D, ZuWallack RL. An evaluation of two approaches to exercise conditioning in pulmonary rehabilitation. *Chest*. 2002; 121(4): 1085-91.

Oliveira NR, Marques SO, Luciano TF, Pauli JR, Moura LP, Caperuto E, Pieri BL, Engelmann J, Scaini G, Streck EL, Lira FS, Pinho RA, Ropelle ER, Silva AS and De Souza CT. Treadmill training increases SIRT-1 and PGC-1 alpha protein levels and AMPK phosphorylation in quadriceps of middle-aged rats in an intensity-dependent manner. *Mediators of inflammation*. 2014;2014: 987017.

Parikh R, Shah TG, Tandon R. COPD exacerbation care bundle improves standard of care, length of stay, and readmission rates. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:577–583.

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

Peeri M, Amiri S. Protective effects of exercise in metabolic disorders are mediated by inhibition of mitochondrial-derived sterile inflammation. *Medical hypotheses*. 2015;85(6):707- 9.

Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio. Tabagismo PETab. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE Diretoria de Pesquisas Coordenação de Trabalho e Rendimento. 2008.

Pette D, Staron R S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech*. 2000; 15;50(6):500-9.

Piepoli MF, Crisafulli A. Pathophysiology of human heart failure: importance of skeletal muscle myopathy and reflexes. *Exp Physiol*. 2014; 99(4):609-15.

Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, Dal-Pizzol F and Moreira JC. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell biol int*. 2006;30(10): 848-53.

Pinho RA, Chiesa D, Mezzomo KM, Andrades ME, Bonatto F, Gelain D, Dal Pizzol F, Knorst MM, Moreira JC. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients submitted to a rehabilitation program. *Respiratory medicine*. 2007;101(8): 1830-5.

Polidori MC, Mecocci P, Cherubini A, Senin U. Physical activity and oxidative stress during aging. *Int J Sports Med*. 2000; 21(3): 154-7.

Puhan MA, Schünemann HJ, Frey M, Scharplatz M, Bachmann LM. How should COPD patients exercise during respiratory rehabilitation? Comparison of exercise modalities and intensities to treat skeletal muscle dysfunction. *Thorax*. 2005; 69: 367-75.R

Rajanbabu V, Galam L, Fukumoto J, Enciso J, Tadikonda P, Lane TN, Bandyopadhyay S, Parthasarathy PT, Cho Y, Cho SH, Lee YC, Lockey RF, Kolliputi N. Genipin suppresses NLRP3 inflammasome activation through uncoupling protein-2. *Cell Immunol*. 2015;297(1):40-5.

Reichert J, Araújo AJ, Gonçalves, CMC. Diretrizes para Cessação do Tabagismo 2008. *J Bras Pneumol*. v. 34, nº 10, p. 845-880, 2008.

Reid MB. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol*. 2001. 90: 724 –731, 2001.

Rennie, M.J. Body maintenance and repair: how food and exercise keep the musculoskeletal system in good shape. *Exp Physiol*. 2005;90(4):427-36.

Rinaldi M, Maes K, De Vleeschauwer S, Thomas D, Verbeken EK, Decramer M, et al. Long-term nose-only cigarette smoke exposure induces emphysema and mild skeletal muscle dysfunction in mice. *Dis Model Mech*. 2012; 5(3): 333-41.

Rodgman A, Perfetti TA. *The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke* (second ed.)1473, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Taton, London, New York (2013).

Rom O, Kaisari S, Aizenbud D, Reznick AZ. Identification of possible cigarette smoke constituents responsible for muscle catabolism. *J Muscle Res Cell Motil*. 2012;33(3-4):199-208.

Rosemberg, J. *Nicotina-droga universal*. São Paulo: Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo; 2003.

Rosemberg, J. *Pandemia do Tabagismo: Enfoques Históricos e Atuais*. São Paulo, Secretaria Estadual de Saúde, 2002.

Rovina N, Koutsoukou A, Koulouris NG. Inflammation and immune response in COPD: where do we stand? *Mediators Inflamm*. 2013;2013:413735.

Sachdev S, Davies KJ. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jan 15;44(2):215-23.

Sadowska AM, van Overveld FJ, Górecka D, Zdral A, Filewska M, Demkow UA, Luyten C, Saenen E, Zielinski J, De Backer WA. The interrelationship between markers of inflammation and oxidative stress

in chronic obstructive pulmonary disease: modulation by inhaled steroids and antioxidant. *Respir Med.* 2005;99(2):241-9.

Salzano S, Checconi P, Hanschmann EM, Lillig CH, Bowler LD, Chan P, et al. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(33): 12157-62.

Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, Gayraud-Morel B, Guenou H, Malissen B, Tajbakhsh S, Galy A. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development.* 2011;138(17):3647-56.

Sanders MG, Parsons MJ, Howard AG, Liu J, Fassio SR, Martinez JA, Bouchier-Hayes L. Single-cell imaging of inflammatory caspase dimerization reveals differential recruitment to inflammasomes. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1813.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004;117(3):399-412.

Schols AM, Broekhuizen R, Weling-Scheepers CA, Wouters EF. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(1): 53-9.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010;140(6):821-32.

Segalés J, Perdiguero E, Muñoz-Cánoves P. Epigenetic control of adult skeletal muscle stem cell functions. *FEBS.* 2015; 282(9): 1571–1588.

Seymour JM, Spruit MA, Hopkinson NS, et al. The prevalence of quadriceps weakness in COPD and the relationship with disease severity. *Eur Respir J.* 2010;36(1):81–88.

Shenderov K, Riteau N, Yip R, Mayer-Barber KD, Oland S, Hieny S, Fitzgerald P, Oberst A, Dillon CP, Green DR, Cerundolo V, Sher A. Cutting edge: Endoplasmic reticulum stress licenses macrophages to produce mature IL-1 β in response to TLR4 stimulation through a caspase-8- and TRIF-dependent pathway. *J Immunol.* 2014;192(5):2029-33.

Silva EG, Dourado VZ. Treinamento de força para pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. *Rev Bras Med Esporte.* 2008;14(3):231-8.

Silva LA, Pinho CA, Scarabelot KS, Fraga DB, Volpato AM, Boeck CR, et al. Physical exercise increases mitochondrial function and

reduces oxidative damage in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* 2009;105:861–867.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175: 184–191.

Siniscalco D, Sapone A, Giordano C, Cirillo A, de Novellis V, de Magistris L, Rossi F, Fasano A, Maione S, Antonucci N. The expression of caspases is enhanced in peripheral blood mononuclear cells of autism spectrum disorder patients. *J Autism Dev Disord.* 2012;42(7):1403-10.

Souza, PS, Gonçalves, ED, Pedroso GS, Farias HR, Junqueira SC, Marcon R, Calixto J B, et al. Physical Exercise Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Peripheral Immune Response and Blood-Brain Barrier Disruption. *Mol Neurobiol.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0014-0>.

Spada C, Treitinger A, Souza MA. Prevalência do tabagismo em doadores de sangue da região serrana de Santa Catarina. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 28: 9-23. 2006.

Spruit MA, Gosselink R, Troosters K, Paepe K, Decramer M. Resistance versus endurance training in patients with COPD and peripheral m

Stewart MD, Lopez S, Nagandla H, Soibam B, Benham A, Nguyen J, Valenzuela N, Wu HJ, Burns AR, Rasmussen TL, Tucker HO, Schwartz. Mouse myofibers lacking the SMYD1 methyltransferase are susceptible to atrophy, internalization of nuclei and myofibrillar disarray. *Dis Model Mech.* 2016;9(3):347-59.

Sukhanov S, Semprun-Prieto L, Yoshida T, Michael Tabony A, Higashi Y, Galvez S, et al. Angiotensin II, oxidative stress and skeletal muscle wasting. *Am J Med Sci.* 2011; 342(2): 143-7.

Szklo AS, Sampaio MM, Fernandes EM, Almeida LM. Smoking of non-cigarette tobacco products by students in three Brazilian cities: should we be worried? *Cad Saude Publica.* 2011 Nov;27(11):2271-5.

Tashkin DP, Murray RP. Smoking cessation in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2009;103(7):963-74.

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* 1992;356(6372): 768-74.

Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJ, Moriya HT, et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J.* 2012; 39(2): 254-64.

Torres LHL. Efeitos da inalação da fumaça do cigarro no estresse oxidativo do sistema nervoso central de camundongos jovens. Dissertação de Mestrado. São Paulo, 2009.

Tromm CB, Pozzi BG, Paganini CS, Marques SO, Pedrosa GS, Souza PS, Silveira PC, Silva LA, De Souza CT, Pinho RA. The role of continuous versus fractionated physical training on muscle oxidative stress parameters and calcium-handling proteins in aged rats. *Aging Clin Exp Res.* 2015; 30:1-19.

Tuder RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 2012;122(8):2749-55.

Vaart HV, Postma DS, TimeS W, Hacken NHT. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax.* 2004; 59(8):713-21.

Valença SS e Porto LC. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. *J. Bras Pneumol.* 2008;34(10):787-795.

Valença SS, Castro P, Pimenta WA, Lanzetti M, Silva SV, Barja-Fidalgo C, Koatz VL and Porto LC. Light cigarette smoke-induced emphysema and NFkappaB activation in mouse lung. *Int J Exp Pathol.* 2006;87(5):373-81.

Valença SS, da Hora K, Castro P, Moraes VG, Carvalho L, Porto LC. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. *Toxicol Pathol.* 2004;32(3):351-6.

Van den Borst, Bauer DC, Kritchevsky SB, Liu y, Newman AB, Harris TB, et al. Is age-related decline in lean mass and physical function accelerated by obstructive lung disease or smoking? *Thorax.* 2011;66(11):961-9.

Van Hall G. Cytokines: muscle protein and amino acid metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2012;15:85-91.

Van Wessel T, de Haan A, van der Laarse WJ, Jaspers RT. The muscle fiber type-fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? *Eur J Appl Physiol.* 2010;110(4):665-94.

Varisco MC. Avaliação da exposição ocupacional ao monóxido de carbono em trabalhadores de postos de combustíveis. Trabalho de conclusão de curso. Novo Hamburgo, 2004.

Vaziri ND. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004;13: 93-99.

Viegas CAA. Formas não habituais de uso do tabaco. *J Bras Pneumol*. 2008;34(12):1069-1073.

Vieira RP, de Andrade VF, Duarte AC, et al. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(4):L670–L679.

Vierck, J, O'Reilly, B, Hossner, K, Antonio, J, Byrne, K, Bucci, L, Dodson, M. Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. *Cell Biol Int*. 2000;24(5):263-72.

Wahl P, Brixius K, Bloch W. Exercise-induced stem cell activation and its implication for cardiovascular and skeletal muscle regeneration. *Minim Invasive Ther Allied Technol*. 2008;17(2):91-9.

Waning DL, Mohammad KS, Reiken S, Xie W, Andersson DC, John S, et al. Excess TGF- β mediates muscle weakness associated with bone metastases in mice. *Nat Med*. 2015;21(11):1262-1271.

Waschki B, Kirsten AM, Holz O, Mueller KC, Schaper M, Sack AL, Meyer T, Rabe KF, Magnussen H, Watz H. Disease progression and changes in physical activity in patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:295–306.

Watz H, Pitta F, Rochester CL, Garcia-Aymerich J, ZuWallack R, Troosters T, et al. An official European Respiratory Society statement on physical activity in COPD. *Eur Respir J*. 2014;44(6):1521–1537.

West R, Shiffman S. Smoking patterns. In: West R, Shiffman S, editors. *Fast Facts: smoking cessation*. Oxford: Health Press; 2007; 14-21.

Williams GN, Higgins MJ, Lewek MD. Aging skeletal muscle: physiologic changes and the effects of training. *Phys Ther*. 2002;82:62–68.

World Health Organization (WHO). *Global status report on noncommunicable diseases 2010*, Geneva: WHO; 2011.

World Health Organization. *Noncommunicable diseases and mental health. Global status report on noncommunicable diseases 2014*. Geneva: WHO; 2014.

World Health Organization. *WHO report on the global tobacco epidemic, 2015: raising taxes on tobacco*. Geneva: World Health Organization; 2015.

Wouters E. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2:26-33.

Wright PR, Heck H, Langenkamp H, Franz KH, Weber U. Influence of a resistance training on pulmonary function and performance measures of patients with COPD. *Pneumologie*. 2002;56(7):413-7.

Yamada AK, Verlengia R, Bueno Junior CR. Mechanotransduction pathways in skeletal muscle hypertrophy. *J Recept Signal Transduct Res*. 2012;32(1):42-4.

Zhang J, Summah H, Zhu YG, Qu JM. Nicotinic acetylcholine receptor variants associated with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Respir Res*. 2011; 12(1): 158.

Zhong Z, Zhai Y, Liang S, Mori Y, Han R, Sutterwala FS, Qiao L. TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun*. 2013;4:1611.