

**ANA CAROLINE RIPPI MORENO**

**TREINAMENTO RESISTIDO PREVINE O DESENVOLVIMENTO DE  
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EM RATOS EXPOSTOS À  
FUMAÇA SECUNDÁRIA DE CIGARRO**



**Presidente Prudente**

**2019**

**ANA CAROLINE RIPPI MORENO**

**TREINAMENTO RESISTIDO PREVINE O DESENVOLVIMENTO DE  
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EM RATOS EXPOSTOS À  
FUMAÇA SECUNDÁRIA DE CIGARRO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia - FCT/UNESP, campus de Presidente Prudente, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim

Presidente Prudente  
2019

M843t

Moreno, Ana Caroline Rippi

TREINAMENTO RESISTIDO PREVINE O DESENVOLVIMENTO DE  
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EM RATOS EXPOSTOS À FUMAÇA  
SECUNDÁRIA DE CIGARRO / Ana Caroline Rippi Moreno. -- , 2019

39 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas, Araraquara,

Orientadora: Patrícia Monteiro Seraphim

Coorientadora: Franciele Marques Vanderlei

1. Biogênese e dinâmica mitocondrial. 2. Treinamento resistido. 3. Exposição a  
fumaça secundária de cigarro. 4. Hipertensão arterial pulmonar. 5. Ratos Wistar. I.

Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas,  
Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

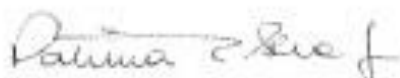
**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** TREINAMENTO RESISTIDO PREVINE O DESENVOLVIMENTO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EM RATOS EXPOSTOS À FUMAÇA SECUNDÁRIA DE CIGARRO

**AUTORA:** ANA CAROLINE RIPPI MORENO

**ORIENTADORA:** PATRÍCIA MONTEIRO SERAPHIM

**COORIENTADORA:** FRANCIELE MARQUES VANDERLEI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em FISIOTERAPIA, área: Avaliação e Intervenção em Fisioterapia pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM

Departamento de Fisioterapia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente



Profa. Dra. GISELE ALBORGHETTI NAI

Lab. de Anatomia Patológica / Universidade do Oeste Paulista de Presidente Prudente (Unoeste)



Profª, Drª, MIRIAN AYUMI KURAUTI

Patologia / Universidade Estadual de Maringá

Presidente Prudente, 25 de janeiro de 2019

## **Agradecimentos:**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e todos anjos de luz, especialmente meu guardião e Nossa Senhora, por intercederem por mim e me proporcionarem tantas oportunidades e decisões positivas.

Meus pais (Almir Martines Moreno e Ivanilda Ap Rippi Moreno), por todo esforço e dedicação em priorizar meus estudos, sem o incentivo e apoio de vocês não teria atingido essa etapa tão cedo.

Minha irmã (Camila Rippi Moreno), que é um espelho de mulher, com certeza minha família é minha inspiração maior.

Meu namorado (Rodolfo Camarotto Santos), que segue me apoiando à 10 anos, superando a distância e me dando apoio para decisões futuras, com certeza seu amor é a base do meu bem estar.

Minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patricia Monteiro Seraphim, me orientando desde a iniciação científica, não desistindo da pesquisa mesmo em momentos difíceis com pouco incentivo e apoio financeiro. Sem dúvidas devo muito do meu aprendizado a você, não há palavras suficiente para agradecer o tanto que a senhora me agregou.

Minhas co orientadoras Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisele Alborghetti Nai e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Franciele Marques Vanderlei, que disponibilizaram oportunidades que enriqueceram meu conhecimento e incentivaram o desenvolvimento desse mestrado.

Os espaços onde tive oportunidade de atuar como profissional e todas minhas alunas queridas do Studio Dayana Macedo e Vitta fisioterapia e fitness. Meus pacientes domiciliares que com alegria exerci minha formação de fisioterapeuta. Com pouco financiamento no nosso país, o auxílio financeiro que me propuseram foi essencial.

A todos meus amigos, em especial minhas amigas de casa Allysiê Cavina e Lara Lopes, minhas amigas de graduação Amanda Paula Balan e Vanessa Van den Broek, minhas amigas de laboratório Caroline Laurindo e Karen Gregorio, vocês com certeza são presentes que a UNESP me concedeu para vida.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Presidente Prudente, onde tive a oportunidade de desenvolver minha graduação, iniciação científica e mestrado, me orgulho de ser Unespiana.

Ao meu gato e companheiro Logan, que ronronou em todos momentos de tensão e estresse.

E não menos importante todos os animais que cederam suas vidas por esse estudo, com certeza não será em vão.

*“Viva a tua maneira  
Não perca a estribeira  
Saiba do teu valor  
E amanheça brilhando mais forte  
Que a estrela do norte  
Que a noite entregou!”  
(O Teatro Mágico - Camarada D'água)*

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	4
LISTA DE TABELAS .....	6
LISTA DE ABREVIações: .....	7
RESUMO .....	4
ABSTRACT .....	6
INTRODUÇÃO .....	8
OBJETIVOS .....	10
<b>Geral</b> .....	10
<b>Específicos</b> .....	10
MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
<b>Caracterização da amostra</b> .....	11
<b>Exposição à fumaça secundária de cigarro</b> .....	11
Fase de adaptação.....	12
Fase experimental.....	12
<b>Intervenção: Treinamento Resistido</b> .....	12
Fase de adaptação.....	12
Teste de carga máxima suportada (CMS) <sup>(27)</sup> .....	12
Fase experimental.....	13
<b>Eutanásia</b> .....	13
<b>Análises séricas</b> .....	14
<b>Análise anatomopatológico</b> .....	14
1) Na Traqueia: .....	15
2) No pulmão:.....	15
3) No coração:.....	15
4) No fígado:.....	15
5) No músculo esquelético gastrocnêmio:.....	15
<b>Densidade de colágeno (Dimensão Fractal)</b> .....	15
<b>Análise de expressão gênica</b> .....	16
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	17
RESULTADOS.....	17
DISCUSSÃO .....	29
REFERÊNCIAS .....	35
ANEXO 1 .....	39

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Figura demonstrativa do protocolo de escalada.....	13
<b>Figura 2.</b> Linha do tempo de intervenções .....	14
<b>Figura 3.</b> Evolução do peso corporal por semana.....	18
<b>Figura 4.</b> Avaliação histopatológica do pulmão .....	20
<b>Figura 5.</b> A- Espessura da artéria pulmonar .....	21
<b>Figura 6.</b> A- Espessura do ventrículo direito .....	22
<b>Figura 7.</b> A- Número das células de Kupffer .....	23
<b>Figura 8.</b> A- Diâmetro das fibras musculares.....	24
<b>Figura 9.</b> Dimensão Fractal.....	25
<b>Figura 10.</b> Expressão gênica de Cyps.....	25
<b>Figura 11.</b> Expressão gênica de MnSod.....	26
<b>Figura 12.</b> Expressão gênica de Nos3.....	26
<b>Figura 13.</b> Expressão gênica de Tfam .....	27
<b>Figura 14.</b> Expressão gênica de Nrf1 .....	27
<b>Figura 15.</b> Expressão gênica de Mfn2.....	28
<b>Figura 16.</b> Expressão gênica de Fis1 .....	28
<b>Figura 17.</b> Expressão gênica de Ppargc1a. ....	29



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Genes e respectivos Primers.....	17
---	----

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Ganho de peso, pesos teciduais e consumo de ração dos animais ..... 19

**Tabela 2.** Glicemia, colesterol total, HDL e triglicerídeos séricos. .... 19

## LISTA DE ABREVIÇÕES:

Akt: Proteína quinase B

AMPK: proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

ATP-CP: Trifosfato de adenosina fosfato de creatina

CE: Grupo controle exercitado

CEUA: Comissão de ética no uso de animais

CGA: Campos de grande aumento

CMS: Carga máxima suportada

CS: Grupo controle sedentário

Cytc: Citocromo C

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPOC: Doenças pulmonares obstrutivas crônicas

DRP1: Proteína de relação dinâmica 1

EPM: Erro padrão da média

ERO: Espécies reativas de oxigênio

FE: Grupo fumante exercitado

FS: Grupo fumante sedentário

HDL: Lipoproteína de alta intensidade

HE: Hematoxilina-eosina

hFis1 (*Fis1*): Proteína de fissão 1

HP: Hipertensão pulmonar

HPA: Hipertensão arterial pulmonar

MFN2 (*Mfn2*): Mitofusina 2

MNSOD (*MnSod*): Superóxido Dismutase de Manganês

mTOR: alvo de rapamicina em mamíferos

NC: Número de ciclos

Nos3: Óxido Nítrico Sintase 3

NRF-1 (*Nrf1*): Fator respiratório nuclear 1

OMS: Organização mundial da saúde

PB: Pares de base

PCR: Reação em cadeia da Polimerase

PGC-1 $\alpha$  (*Ppargc1a*): Coativador 1 $\alpha$  do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma

RLO: Radicais livres de oxigênio

Rpl19: Proteína Ribosomal L19 (Gene constitutivo)

RT: Transcriptase reversa

TFAM (*Tfam*): Fator de transcrição mitocondrial

TR: Treinamento resistido

T°C: Temperatura de anelamento

VD: Ventrículo direito

VE: Ventrículo esquerdo

## RESUMO

O tabagismo é uma das maiores ameaças à saúde pública. A exposição à fumaça secundária de cigarro está associada com mais de 50 doenças, destacando o enfisema pulmonar. O treinamento resistido (TR) é uma ferramenta eficaz para a prevenção e promoção da saúde. Pouco se sabe sobre efeitos de treinamento resistido em tecidos muscular cardíaco e esquelético de modelos experimentais expostos à fumaça secundária de cigarro. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do treinamento resistido em ratos expostos a fumaça secundária do cigarro. Trinta e dois ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: Controle Sedentário (CS), Fumante Sedentário (FS), Controle Exercitado (CE) e Fumante Exercitado (FE). Os animais dos grupos FS e FE foram expostos à fumaça secundária de quatro cigarros por 30 minutos duas vezes ao dia, cinco dias na semana. Os animais exercitados (CE e FE) foram submetidos ao teste de carga máxima suportada (CMS) e o treinamento utilizado foi subida em escada vertical com incremento, uma vez ao dia, cinco dias por semana. Ambas intervenções foram realizadas por 16 semanas. Após a eutanásia foi coletado sangue para dosagem de glicemia, colesterol total, HDL e triglicerídeos. Coração, traqueia, pulmão, fígado e músculo gastrocnêmio foram coletados para análise anatomopatológicas. A análise gênica de marcadores da dinâmica e biogênese mitocondrial foi realizada pela técnica de RT-PCR em fragmentos do coração e músculo gastrocnêmio. Observou-se que os animais CS apresentaram maior ganho comparado a todos demais grupos ( $p < 0,05$ ), o grupo CE maior do que os grupos fumantes (FS e FE;  $p < 0,05$ ) e o grupo FE menor ganho comparado com todos ( $p < 0,05$ ), associado ao menor consumo de ração ( $p = 0,0005$ ). O grupo FE apresentou redução de HDL (FE vs CE  $p = 0,02$ ). Nos grupos fumantes (FS e FE) houve presença de enfisema pulmonar (FS e FE vs CS e CE  $p < 0,0001$ ) e aumento da espessura da artéria pulmonar (FS vs CS e CE e FE vs CS,  $p = 0,003$ ). No coração houve aumento na espessura do ventrículo direito nos animais FS vs CS, CE e FE ( $p < 0,0001$ ). No fígado observou-se aumento de macrófagos nos animais fumantes (FS e FE vs CS  $p = 0,002$ ). No músculo esquelético os animais FE apresentaram redução do diâmetro das fibras musculares (FE vs CS e CE  $p = 0,0002$ ). Na análise gênica foi observado aumento de *Fis1* em gastrocnêmio de FS vs CS ( $p = 0,05$ ) e *Ppargc1a* em coração de FE vs FS ( $p = 0,01$ ). Portanto, conclui-se que embora não tenha prevenido Enfisema e HP, o TR em ratos fumantes preveniu hipertensão arterial pulmonar possivelmente

por melhorar a capacidade oxidativa do músculo cardíaco (aumento de *Ppargc1a*), o que poderia resultar na prevenção do aumento do VD. Entretanto, resultados negativos foram encontrados na ingestão e peso corporal, músculo esquelético (redução do diâmetro das fibras) e no perfil de lipoproteínas (redução do HDL).

**Palavras-chave:** PGC1a, Fumaça secundária, Força muscular, Enfisema Pulmonar, Mitocôndria, Ratos Wistar.

## **RESISTANT TRAINING PREVENTS THE DEVELOPMENT OF PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION IN RATS EXPOSED TO SECONDHAND SMOKE**

### **ABSTRACT**

Smoking is one of the greatest threats to public health. Exposure to secondhand smoke is associated with more than 50 diseases, most notably pulmonary emphysema. Resistance training is an effective tool for prevention and health promotion. Little is known about the effects of high intensity resistance training on cardiac and skeletal muscle tissues of experimental models exposed to cigarette smoke. The aim of this study is to evaluate the effect of resistance training in rats exposed to secondary cigarette smoke. Thirty-two Wistar rats were divided into four groups: Sedentary Control (SC), Sedentary Smoker (SS), Exercised Control (EC) and Exercised Smoker (ES). Animals from the SS and ES groups were exposed to the smoke from four cigarettes for 30 minutes twice daily, five days a week. The animals exercised (EC and ES) underwent the maximum supported load test (CMS) and the utilized training was the climb on a vertical ladder with increment, once a day, five days a week. Both interventions were performed for 16 weeks. After euthanasia, blood was collected to measure fasting blood glucose dosage, total cholesterol, HDL, and triglycerides. Heart, trachea, lung, liver and gastrocnemius muscle were collected for anatomopathological analysis. Gene analysis of dynamics markers and mitochondrial biogenesis was performed by the RT-PCR technique in fragments of the heart and gastrocnemius muscle. It was observed that SC animals showed a higher gain compared to all other groups ( $p < 0.05$ ), the EC group showed a higher gain than the smoking groups (SS and ES,  $p < 0.05$ ) and the ES group had a lower gain compared to all ( $p < 0.05$ ), associated with lower feed intake ( $p = 0.0005$ ). The ES group had HDL reduction (ES vs EC  $p = 0.02$ ). Pulmonary emphysema (SS and SE vs SC and EC  $p < 0.0001$ ) and pulmonary artery thickness enlargement (SS vs SC and EC and ES vs SC,  $p = 0.003$ ) were found in the smoking groups (SS and ES). In the heart, there was increase in the right ventricle in the animals from SS vs SC, EC and ES ( $p < 0.0001$ ). In the liver, it was observed increase of macrophages in the smokers animals (SS and ES vs. SC  $p = 0.002$ ). In the skeletal muscle, ES animals presented reduction of muscle fibers (ES vs SC and EC  $p = 0.0002$ ). In the gene analysis, it was observed an increase of Fis1 in gastrocnemius of SS vs SC ( $p = 0.05$ ) and Ppargc1a in the heart of ES vs SS ( $p = 0.01$ ). Therefore, it was concluded that although it did not prevent Emphysema

and HP, the RT in smokers rats has prevented pulmonary arterial hypertension possibly by improving the oxidative capacity of the cardiac muscle (increase of Ppargc1a), which could result in the prevention of increased VD. However, negative results were found in the intake and body weight, skeletal muscle (reduction of fiber diameter) and lipoprotein profile (HDL reduction).

**Key words:** PGC1a, Secondhand smoke, Muscle Strenght, Pulmonary Emphysema, Mitochondria, Wistar rats.



## INTRODUÇÃO

O tabagismo é uma doença evitável, responsável pelo maior índice de mortes no mundo, registrando em média seis milhões por ano <sup>(1)</sup>. O uso do cigarro expõe os usuários a aproximadamente 4720 substâncias nocivas <sup>(2)</sup>, prejudicando a ação e função de diversos tecidos <sup>(3,4)</sup>. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), esse hábito já é considerado uma doença crônica e epidêmica, prevendo para 2030 mais de dez milhões de mortes <sup>(5)</sup>.

O consumo do cigarro é dividido em duas etapas: a etapa particulada e a etapa gasosa. Sabe-se que na etapa gasosa há a produção de dois tipos de fumaça: a primária que atravessa o filtro de fibra de vidro, retirando 99,9% das partículas maiores que 0,1 µm; e a fumaça secundária, a exalada pela queima da ponta do cigarro <sup>(6)</sup>. A etapa secundária ocorre principalmente no período entre uma tragada e outra, correspondendo a 75% da fumaça do cigarro presente nos ambientes, caracterizada por apresentar elevadas concentrações de componentes nocivos <sup>(7)</sup>.

A exposição à fumaça secundária de cigarro é relacionada com o desenvolvimento de mais de 50 doenças. Dentre estas, destaca-se o enfisema pulmonar e a bronquite crônica, denominadas doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC) <sup>(8)</sup>. O público tabagista apresenta 14 vezes mais chances de desenvolverem DPOC e 90% das mortes causadas pelas mesmas ocorrem em tabagistas ou antigos tabagistas <sup>(9)</sup>. As DPOC são a quarta principal causa de morte no mundo, com estimativa de em 2020 atingir a terceira posição <sup>(8)</sup>. Custos socioeconômicos para tratamento dessas e outras doenças relacionadas com o hábito de fumar são elevados, sendo fundamental encontrar ferramentas capazes de prevenir e/ou reduzir os malefícios desenvolvidos por esse hábito.

Recentemente, a prática de treinamento resistido (TR) foi classificada como uma das melhores opções de tratamento para portadores de doenças pulmonares <sup>(10,11)</sup>, destacando-se também como uma ferramenta eficaz para prevenção de resistência à insulina, controle de hipertensão arterial e pulmonar, além de melhorar a qualidade de vida <sup>(12)</sup>. O metabolismo predominante no TR são fontes energéticas anaeróbias envolvendo o Trifosfato de adenosina-fosfato de creatina (ATP-CP) e via Glicolítica <sup>(13)</sup>. Esse método de treinamento garante um bom desempenho de

endurance muscular, associado às produções de força e potências máximas com pausas para recuperação <sup>(14)</sup>.

A organela celular responsável pela produção de ATP é a mitocôndria, através da metabolização de glicose, aminoácidos e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos pelo ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons <sup>(13)</sup>. O TR promove a ativação de fatores relacionados a biogênese mitocondrial como o coativador 1 $\alpha$  do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ), fator de transcrição mitocondrial (TFAM) e fator respiratório nuclear 1 (NRF-1) <sup>(15)</sup>. Essas proteínas reguladoras do processo de transcrição e replicação mitocondrial, são capazes de ativar direta ou indiretamente a expressão de alguns genes metabólicos reguladores do crescimento celular e de genes nucleares necessários para a respiração e replicação do DNA mitocondrial <sup>(16)</sup>.

O bom desempenho mitocondrial é controlado por processos denominados de fusão e fissão, que realizam uma modelação na mitocôndria, sendo a fissão a interligação mitocondrial e a fusão a separação de conteúdos ineficazes <sup>(17)</sup>. A importância do equilíbrio entre ambos processos é garantir mitocôndrias efetivas e conseqüentemente uma capacidade oxidativa positiva, principalmente para tecidos musculares cardíacos e esqueléticos. A proteína Mitofusina 2 (MFN2) é uma das mediadoras da fusão, já a fissão é gerada pela proteína de Relação Dinâmica 1 (DRP1) e seu adaptador de membrana externa de fissão 1 (hFIS1).

Quase todo o oxigênio respirado é utilizado pela mitocôndria através da cadeia de transporte de elétrons, a enzima Citocromo oxidase remove um elétron de cada uma das quatro moléculas reduzidas de Citocromo C, oxidando-as e adicionando estes quatro elétrons ao O<sub>2</sub>, formando água (H<sub>2</sub>O) <sup>(18)</sup>. O aumento do consumo de O<sub>2</sub> provocado pelo TR resulta na formação de radicais livres de oxigênio (RLO) <sup>(18)</sup>. O termo estresse oxidativo é utilizado em circunstâncias nas quais o aumento de RLO resulta em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos e danosos aos tecidos denominadas de espécies reativas de oxigênio (ERO). Como as ERO são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressores, através de atividade de enzimas importantes tais como a Superóxido Dismutase de Manganês (MNSOD) e Óxido Nítrico Sintase 3 (Nos3). Suas funções

são totalmente ativada nas mitocôndrias impedindo a formação de RLO gerado pela respiração mitocondrial <sup>(19)</sup>.

Fisiologicamente, sabe-se que a exposição à fumaça de cigarro resulta em aumento de RLO e ERO <sup>(20)</sup>. Em contrapartida, o TR apresenta resultados positivos em relação a ativação de processos importantes da biogênese e dinâmica mitocondrial em tecido muscular, através do aumento de Cálcio e ação da proteína Calmodulina, que ativando o PGC-1 $\alpha$  pode desenvolver processos positivos na capacidade oxidativa, devido à uma contração muscular intensa e constante com longo período de recuperação <sup>(21)</sup>. Assim, os efeitos positivos do TR são voltados principalmente para os tecidos musculares, podendo desenvolver as fibras e massa musculares, conseqüentemente, gerar uma contração mais eficiente <sup>(22)</sup>. Em tecido muscular cardíaco, o TR previne complicações como a Hipertensão Arterial, Hipertensão pulmonar, quadros de Aterosclerose e níveis alterados de colesterol. Para um resultado satisfatório sobre esses diagnósticos, a técnica de histopatologia, se destaca <sup>(23)</sup>.

Um estudo prévio que utilizou o mesmo protocolo de exposição à fumaça secundária de cigarro que o presente, identificou redução severa da sensibilidade à insulina em apenas 8 semanas de intervenção <sup>(24)</sup>. Apesar de já estar descrito na literatura diversos benefícios do TR, pouco se sabe sobre a associação desta com animais expostos à fumaça secundária de cigarro.

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do treinamento resistido em ratos expostos a fumaça secundária do cigarro.

### **Específicos**

Avaliar em ratos expostos à fumaça de cigarro treinados ou não:

- se o TR influencia o perfil sérico;
- a expressão gênica de marcadores da biogênese mitocondrial: *Ppargc1a*, *Tfam*, *Nrf1*, *Fis1* e *Mfn2* nos músculos esquelético (gastrocnêmio) e cardíaco;
- a expressão gênica de marcadores da dinâmica mitocondrial: *Cycs*, *Nos3* e *MnSod* nos músculos esquelético (gastrocnêmio) e cardíaco;

- alterações anatomopatológicas em traqueia, pulmão, coração, fígado e musculo gastrocnêmio;

- densidade do colágeno cardíaco em ventrículos direito e esquerdo.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT) – UNESP, campus Presidente Prudente, sob o número de protocolo 02/2017.

### **Caracterização da amostra**

Foram utilizados 32 ratos machos Wistar, com 45 dias de idade. As duas primeiras semanas foram para adaptação (7 dias referentes a adaptação ao novo ambiente e 7 dias referentes a adaptações à intervenções e teste carga máxima suportada). Após este período foi dada continuidade as intervenções de TR e exposição à fumaça secundária de cigarro por 16 semanas. Foram alocados 4 animais por caixa, com ração padrão (SUPRA, Brasil) e água à vontade, em biotério com temperatura média de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro/escuro com luz branca de 12h/12h.

O consumo de ração foi avaliado semanalmente. Foi ofertada 160g de ração/dia/caixa toda segunda, quarta e sexta. No dia subsequente era subtraído o restante da ração na caixa do valor em gramas de ração oferecido. Toda semana eram somados os três valores para análise de consumo. O peso corpóreo também foi registrado semanalmente.

Os animais foram divididos em 4 grupos de acordo com a média de peso corpóreo inicial: Controle Sedentário (CS/n=8): sem exposição à fumaça de cigarro e sem TR; Controle Exercitado (CE/n=8): submetidos somente ao TR; Fumante Sedentário (FS/n=8): submetidos somente à exposição à fumaça secundária de cigarro; Grupo Fumante Exercitado (FE/n=8): submetidos à exposição de fumaça secundária de cigarro e ao protocolo de TR.

### **Exposição à fumaça secundária de cigarro**

Os ratos fumantes (FS e FE) foram expostos à fumaça secundária de cigarro seguindo protocolo de estudo anterior do grupo <sup>(24,25)</sup>. O período de 16 semanas de intervenção foi determinado com o objetivo de caracterizar a exposição crônica <sup>(26)</sup>.

### Fase de adaptação

Na primeira semana de exposição, cada 4 animais foram expostos à fumaça secundária de 2 cigarros por 10 minutos, 1 vez ao dia.

### Fase experimental

Nas semanas de experimentação, cada 4 animais foram expostos à fumaça secundária da combustão de 4 cigarros, durante 30 min, 2 vezes por dia, 5 dias/semana, durante 16 semanas. Esta dose, que totaliza 8 cigarros/dia foi determinada a partir de estudos prévios que relataram ser a dose suportada pelos animais, evitando o risco de mortalidade <sup>(24-27)</sup>.

O sistema de inalação utilizado era composto por estrutura de alumínio e vidro (100 x 44 x 44 cm), fechada e dividida em dois compartimentos por um tabique de vidro escuro com cinco pequenos furos. Um dos compartimentos foi utilizado para a colocação dos cigarros acesos e o outro destinado à exposição de quatro animais dentro de uma gaiola. Uma fonte de ar comprimido com um fluxo de 10 L/min era conectada à câmara.

### **Intervenção: Treinamento Resistido**

Os grupos exercitados (CE e FE) foram submetidos ao protocolo de escalada já presente na literatura <sup>(27)</sup>, contando com duas fases, adaptação e experimental.

#### Fase de adaptação

Nos 4 primeiros dias das intervenções, os animais foram adaptados ao hábito de escalar, incentivados por um estímulo manual em sua porção rostral, induzidos a subir até a gaiola presente no topo da escada, onde descansavam por 60 segundos. O protocolo era repetido quatro vezes por dia.

#### Teste de carga máxima suportada (CMS) <sup>(27)</sup>

O teste foi realizado no quinto dia de adaptação a intervenção. Uma carga em anilhas, inicialmente de 75% do peso corpóreo do animal, foi fixada à cauda do animal com uma luva e fita adesiva. A cada escalada completa acrescentava-se 30 gramas de peso. O teste foi interrompido caso o animal realizasse mais de oito repetições e se após três estímulos consecutivos o animal não conseguisse realizar a escalada. A carga máxima registrada era o peso correspondente à última escalada completa <sup>(27)</sup>.

### Fase experimental

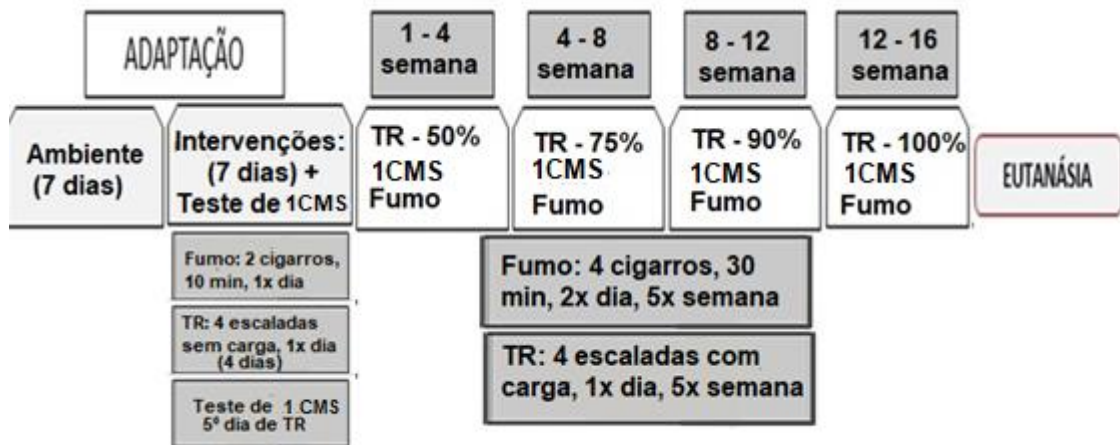
O treinamento foi constituído de quatro séries de escaladas (Figura 1), com intervalos de 60 segundos, cinco vezes por semana (em dias consecutivos), uma vez ao dia. O treinamento iniciou com 50% de 1CMS de cada animal com incremento de carga para 75%, 90% e 100% de 1CMS a cada 4 semanas, resultando em um período experimental de 16 semanas de intervenção, caracterizando um exercício crônico <sup>(27)</sup>.



**Figura 1.** Figura demonstrativa do protocolo de escalada.

### Eutanásia

A anestesia foi realizada com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (60 mg/kg peso corporal) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg peso corporal), após 12h de jejum e 24h após a última sessão de TR e fumo. A eutanásia ocorreu por exsanguinação.



**Figura 2.** Linha do tempo de intervenções realizadas ao longo de 18 semanas. 1CMS = Carga máxima suportada; TR = Treinamento Resistido; Min = minutos.

### Análises séricas

Para as análises séricas, o sangue foi centrifugado (centrífuga Eppendorf 5415R, Hamburgo - Alemanha) a 1500 rpm durante 15 minutos, a 4°C, para separação do soro, o qual, posteriormente, foi refrigerado. Os níveis de glicemia, colesterol total e triglicerídeos foram medidos pelo método enzimático utilizando-se kit específico (KATAL-MG, Bioclin, Brasil). O HDL-colesterol foi determinado por método de precipitação também por kit específico (KATAL-MG, Bioclin, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

### Análise anatomopatológica

Os tecidos fígado, traqueia, pulmão, coração e músculo esquelético gastrocnêmio foram pesados em balança de precisão e posteriormente armazenados em formol tamponado a 10%.

Os pulmões, coração e traqueia foram coletados em conjunto. Após a retirada do coração foi injetado formol tamponado a 10% lentamente através da traqueia para fixação do parênquima pulmonar. Após 24h, foram retirados fragmentos do pulmão direito e esquerdo de cada animal. O coração foi seccionado em corte coronal em nível de átrios e ventrículos e o fígado, traqueia e músculo gastrocnêmio foram seccionados em cortes transversais.

Os cortes foram submetidos ao processamento histológico habitual, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil). Cortes de 5µ foram obtidos e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil). Cortes do coração também foram corados por tricrômio de Masson

(Merck KgaA, Darmstadt Alemanha) para quantificação das fibras colágenas. Os cortes do pulmão e traqueia pelo método PAS-Azul de Alcian (Merck, Germany) para análise da espessura da artéria pulmonar e contagem das células calciformes.

A análise histopatológica foi realizada por único observador, utilizando-se microscópio óptico comum (NIKON, Labophot - Japão). Os parâmetros avaliados foram:

- 1) Na Traqueia: infiltrado inflamatório (0=ausente, 1=leve, 2=moderado, 3=intenso), tipo de célula inflamatória (polimorfonucleares e/ou monucleares) e número de células calciformes, contadas em 10 campos de grande aumento (CGA).
- 2) No pulmão: infiltrado inflamatório intersticial (0=ausente, 1=leve, 2=moderado, 3=intenso), tipo de célula inflamatória (polimorfonucleares e/ou monucleares) e localização (intra-alveolar, intersticial e peribrônquica); congestão tecidual (0=ausente, 1=leve, 2=moderada, 3=intensa); fibrose intersticial (0=ausente, 1=focal, 2=difusa); enfisema [0=ausente, 1=focal (comprometendo apenas parte do parênquima pulmonar), 2=difuso (comprometendo todo parênquima pulmonar)].
- 3) No coração: foi realizada a medida da espessura da parede ventricular livre esquerda, direita e do septo interventricular em duas áreas de cada parede.
- 4) No fígado: congestão tecidual (0=ausente, 1=leve, 2=moderada, 3=intensa); infiltrado inflamatório intersticial (0=ausente, 1=leve, 2=moderada, 3=intensa) e tipo de célula inflamatória presente (polimorfonucleares e/ou monucleares); necrose (0=ausente; 1=presente); colestase (0=ausente, 1=presente); presença e tipo de esteatose (0=ausente, 1= presente: microvesicular e/ou macrovesicular). Foi realizada a contagem das células de Kupffer (macrófagos residentes) em 10 CGA, o que corresponde a cerca de 1mm<sup>2</sup>, em cada amostra.
- 5) No músculo esquelético gastrocnêmio: a análise do diâmetro das fibras musculares do músculo esquelético gastrocnêmio foi realizada em 50 fibras íntegras em CGA.

Todas as imagens foram capturadas utilizando-se o sistema de captura de imagem Leica Application Suíte LAS 4.2.0 (Austrália) e analisadas utilizando o software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH).

#### **Densidade de colágeno (Dimensão Fractal)**

Para realizar a análise da dimensão fractal do ventrículo direito (VD) e esquerdo



(VE), as lâminas coradas com Tricômio de Masson foram fotografadas e passaram pelo processo de binarização, para leitura e análise da dimensão fractal através do método de box-counting, utilizando o software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível gratuitamente na internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

O software Image J considera o box-counting em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço. A análise fractal das lâminas histológicas é a relação entre a resolução e a escala avaliada, considerando como resultado:  $DF = (\log N_r / \log r - 1)$ , sendo  $N_r$  a quantidade de elementos iguais necessários para preencher o objeto original e  $r$  a escala aplicada ao objeto. Com isso, a dimensão fractal calculada com o software Image J ficara sempre entre 0 e 2, verificando a densidade de colágeno cardíaco.

### **Análise de expressão gênica**

Para a expressão dos genes envolvidos na biogênese e função mitocondrial (Quadro 1) em músculo esquelético gastrocnêmio e coração utilizamos a técnica de RT-PCR. Para isso foi extraído RNA total em reagente BRAZOL (LGCBio, SP - Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

Após a leitura de concentração de RNA total por amostra, foi realizado o ensaio de Transcriptase Reversa, através do uso de 1µg de RNA total, primers randômicos e enzima MLV Reverse Transcriptase (200U/ul; PROMEGA, Wisconsin - EUA) em termociclador Techne (Cole Parmer, UK). Em seguida, o ensaio da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação dos genes foi realizado também obedecendo às sugestões do fabricante (Promega Biotecnologia do Brasil), com posterior visualização do gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio em transluminador com luz UV (KODAK Molecular Imaging Software Version 4.0,2-User e Eletronic UV Transilluminator Ultra. Lum. Inc. Nova Iorque - EUA). As imagens obtidas foram fotografadas e avaliadas pelo software gratuito Scion Image (Scion Corporation, Maryland - EUA.). As expressões dos genes alvos foram normalizadas pela expressão do gene constitutivo Rpl19.

### Quadro 1. Genes e respectivos Primers

Gene	Sequência dos Oligos 5'-3'	pB	N.C	T°C	GenBank
<b><i>Ppargc1a</i></b>	Sense - TGACTGGCGTCATTCAGGAG	84	35	57°	NM_031347.1
	Anti-sense - CAGGGCAGCACACTCTATGT				
<b><i>Tfam</i></b>	Sense - TGATCTCATCCGTCGCAGTG	205	37	55°	AJ312746.1
	Anti-sense - TGCATTCAGTGGGCAGAAAGT				
<b><i>Cyca</i></b>	Sense - CTTGGGCTAGAGAGCGGGA	259	39	55°	NM_012839.2
	Anti-sense - CTCCCCAGGTGATACCTTTGT				
<b><i>Nrf1</i></b>	Sense - TACAAGGCGGGGGACAGATA	94	39	55°	NM_001100708.1
	Anti-sense - ACTCCATCTGGGCCATTAGC				
<b><i>Mfn2</i></b>	Sense - ATCTGGACCTGAATCGGCAC	123	38	56°	NM_130894.4
	Anti-sense - AGAGCAGGGACATCTCGTTTC				
<b><i>Fis1</i></b>	Sense - TTTGAATACGCCTGGTGCCT	164	40	56°	NM_001105919.1
	Anti-sense - GCCTTTTCATATTCCTTGAGCCG				
<b><i>Nos3</i></b>	Sense - TGACCCTCACCGATACAACA	64	41	55°	NM_021838.2
	Anti-sense - CGGGTGTCTAGATCCATGC				
<b><i>MnSod</i></b>	Sense - ACCGAGGAGAAGTACCACGA	285	33	55°	Y00497.1
	Anti-sense - CCTGAACCTTGGACTCCAC				
<b><i>Rpl19</i></b>	Sense - CAATGAAACCAACGAAATCG	71	27	58°	NM_017008.4
	Anti-sense - TCAGGCCATCTTTGATCAGCT				

**Quadro 1.** pb= Pares de Base. N.C= Número de Ciclos; T°C= Temperatura de Anelamento; GenBank= NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) Sequência de referência.

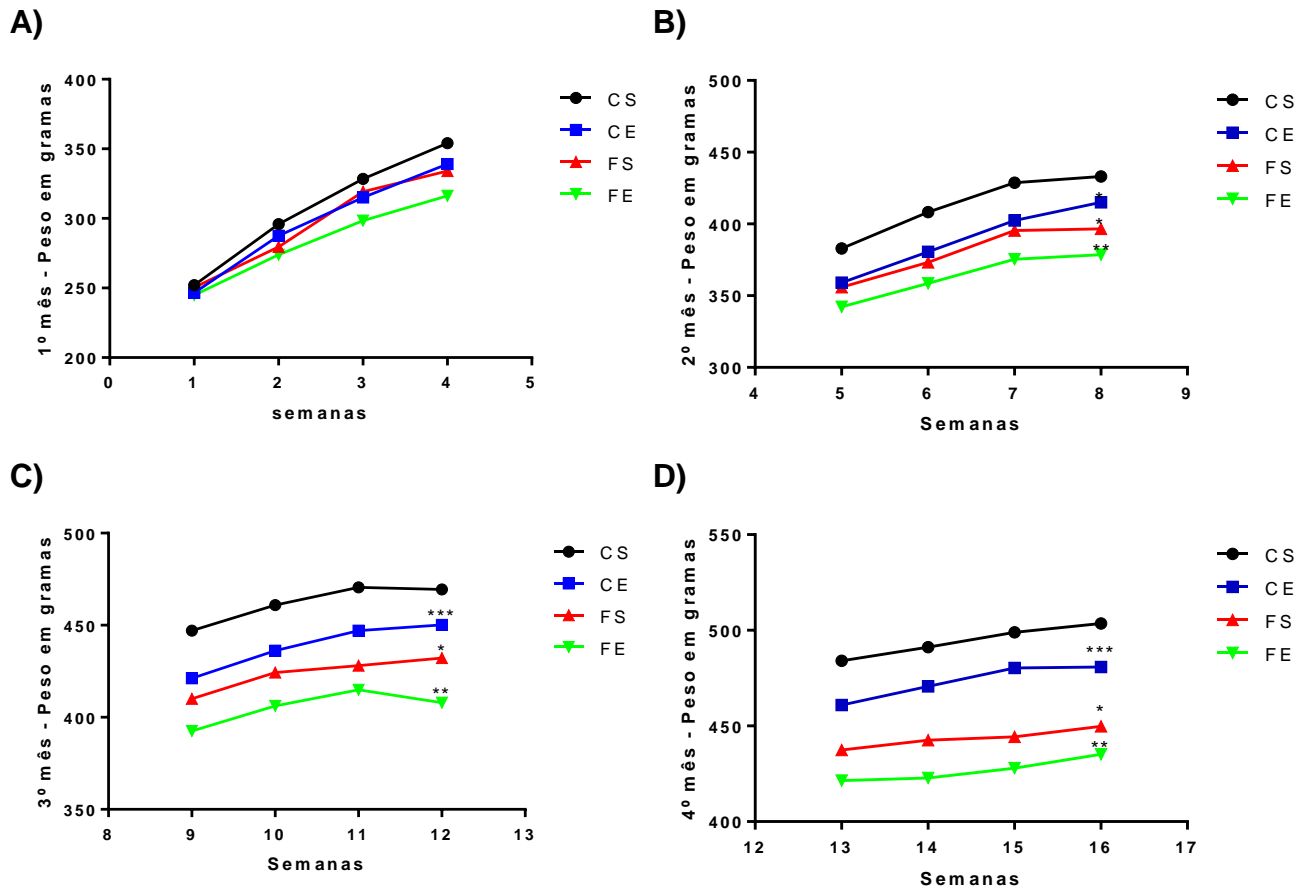
### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para os resultados quantitativos foi utilizado ANOVA Two Way, com pós teste de Tukey, e para análises variáveis categóricas foi utilizado Kruskal Wallis. Valores de P inferiores a 5% foram considerados estatisticamente significativos. Utilizou-se o software GraphPad Prism, versão 6.0.

### RESULTADOS

A evolução do peso corpóreo dos animais foi analisada semanalmente. No primeiro mês de intervenção (Figura 3A), os animais não apresentavam diferença no peso corporal, a partir do segundo mês de intervenção, houve um aumento significativo do peso corpóreo do grupo CS (Figura 2B), intensificando no terceiro (Figura 3C) e quarto (Figura 3D) mês, com significância em relação aos demais grupos

(CE, FS e FE) ( $p>0,05$ ). O grupo CE também apresentou aumento significativo de peso comparado aos animais fumantes (FS e FE) e o grupo FE menor evolução comparado a todos demais grupos ( $p>0,05$ ).



**Figura 3.** Evolução do peso corporal por semana. A. 1º mês não houve significância. B. 2º mês \*  $p<0,05$  vs CS e FE. \*\*  $p<0,05$  vs CS. C. 3º mês \*  $p<0,05$  vs CS e FE. \*\*  $p<0,05$  vs CS. \*\*\*  $p<0,05$  vs CS, FS e FE. D. 4º mês \*  $p<0,05$  vs CS e FE. \*\*  $p<0,05$  vs CS. \*\*\*  $p<0,05$  vs CS, FS e FE. Valores apresentados em um gráfico de evolução com média ( $n=8$ /grupo).

Ao analisarmos a Tabela 1, observa-se que os grupos fumantes apresentam menores pesos corpóreos. Entretanto apenas o grupo FE apresentou redução significativa no consumo de ração em comparação a todos demais grupos ( $p<0,0001$ ), além de redução no peso corpóreo final (15%,  $p=0,005$ ), no tecido adiposo (60%,  $p=0,0008$ ), coração (20%,  $p=0,02$ ) e fígado (10%,  $p=0,02$ ) quando comparado ao grupo CS. Os tecidos pulmonares e músculo esquelético gastrocnêmio (direito e esquerdo) apresentaram pesos semelhantes entre os grupos. Adicionalmente pode-se observar que o grupo FS apresenta menor massa gorda comparado ao grupo CS, sem variar seu peso corpóreo.

**Tabela 1.** Ganho de peso, pesos teciduais e consumo de ração dos animais

	<b>CS</b>	<b>CE</b>	<b>FS</b>	<b>FE</b>
<b>Ganho de peso (g)</b>	230,5±10,8	217,2±13,2	184,7±6,3*	169,1±9,6 <sup>#</sup>
<b>Consumo de ração (g)</b>	29,5±0,5	29,3±0,6	28,4±0,4	26,5±0,4 <sup>#</sup>
<b>Tecido adiposo (g)</b>	5,4±1,0	4,5±0,3	3,1±0,3*	2,0±0,2 <sup>#</sup>
<b>Coração (g)</b>	1,6±0,0	1,5±0,0	1,5±0,0	1,3±0,0*
<b>Fígado (g)</b>	12,6±0,4	12,4±0,4	11,9±0,5	10,2±0,3 <sup>#</sup>
<b>Pulmão (g)</b>	3,2±0,1	3,1±0,2	3,0±0,1	3,0±0,1
<b>Gastrocnêmio (g)</b>	2,8±0,1	2,7±0,1	2,7±0,1	2,6±0,1

Ganho de peso (subtração do peso inicial no peso final): \* p=0,005 vs CS; #p=0,005 vs CS e CE. Consumo de ração (dia/animal): # p=0,0005 vs CS e CE. Tecido adiposo: \* p=0,0008 vs CS; # p=0,0008 vs CS e CE. Coração: \* p=0,02 vs CS. Fígado: # p=0,02 vs CS e CE. Valores expressos em média ± EPM (n=8/grupo).

Na Tabela 2 são apresentadas as análises séricas. Não houve alteração na glicemia em jejum, colesterol total e triglicerídeos. Já a concentração de HDL no grupo FE estava reduzida em 30% em comparação ao grupo CE (p=0,02).

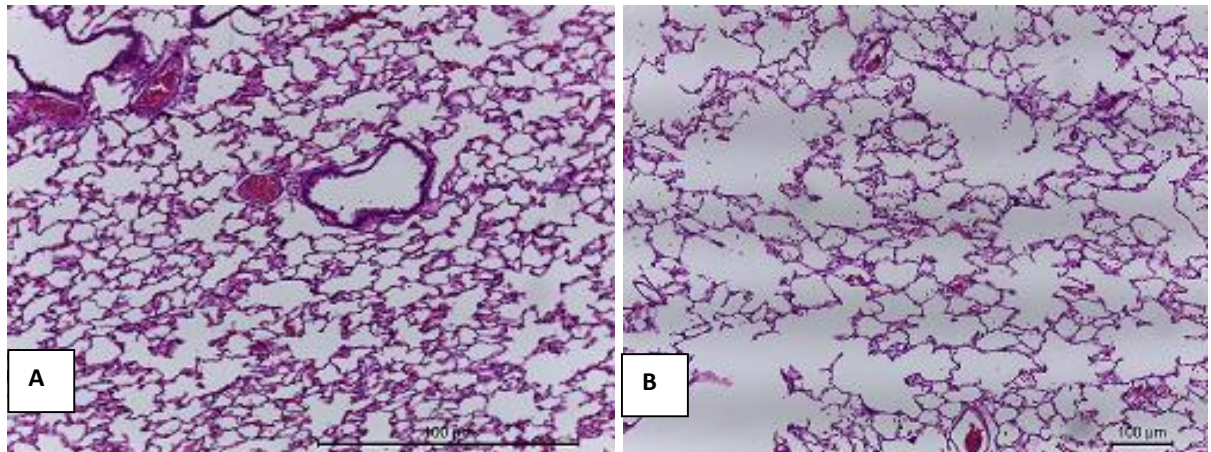
**Tabela 2.** Glicemia, colesterol total, HDL e triglicerídeos séricos.

	<b>CS</b>	<b>CE</b>	<b>FS</b>	<b>FE</b>
<b>Glicemia de jejum (mg/dL)</b>	84,8±2,5	80,6±1,9	80,1±2,8	82,8±2,6
<b>Colesterol Total (mg/dL)</b>	72,1±5,0	64,4±7,3	59,4±6,5	51,6±6,0
<b>HDL (mg/dL)</b>	38,0±1,8	42,7±1,9	37,5±2,7	30,8±2,9*
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	115,3±14,2	96,1±8,2	82,2±8,4	91,5±8,6

Análises séricas. Glicemia, Colesterol total e Triglicerídeos sem diferença estatística. HDL: \*p=0,02 vs CE. Valores de concentrações expressas em média ± EPM (n=8/grupo).

A traqueia não apresentou infiltrado inflamatório e alteração na contagem de células caliciformes.

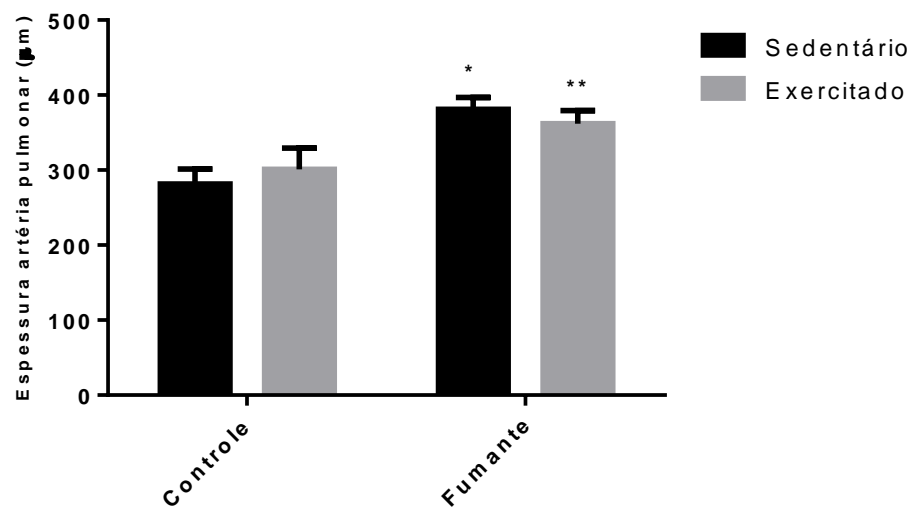
O tecido pulmonar não mostrou congestão tecidual e fibrose intersticial, porém foi observado enfisema pulmonar nos grupos fumantes (Figura 4) (FS e FE, p<0,0001). Todos os animais FS (n=8) e 7 animais do grupo FE apresentaram enfisema difuso.

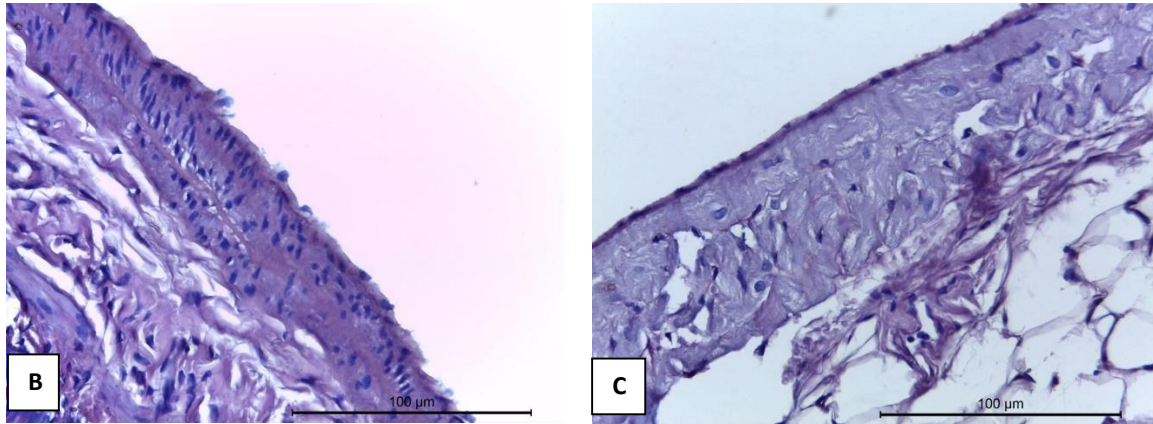


**Figura 4.** Avaliação histopatológica do pulmão. A- Parênquima pulmonar sem alteração (animal do grupo CS), HE, aumento de 100x. B- Enfisema pulmonar, notar espaços alveolares dilatados (animal do grupo FS), HE, aumento 200x.

Na Figura 5 é apresentado o resultado da avaliação de espessura da artéria pulmonar, observa-se aumento significativo nos grupos fumantes, com diferenças entre os grupos FS e controles (CS e CE), e FE e CS ( $p=0,003$ ).

A)

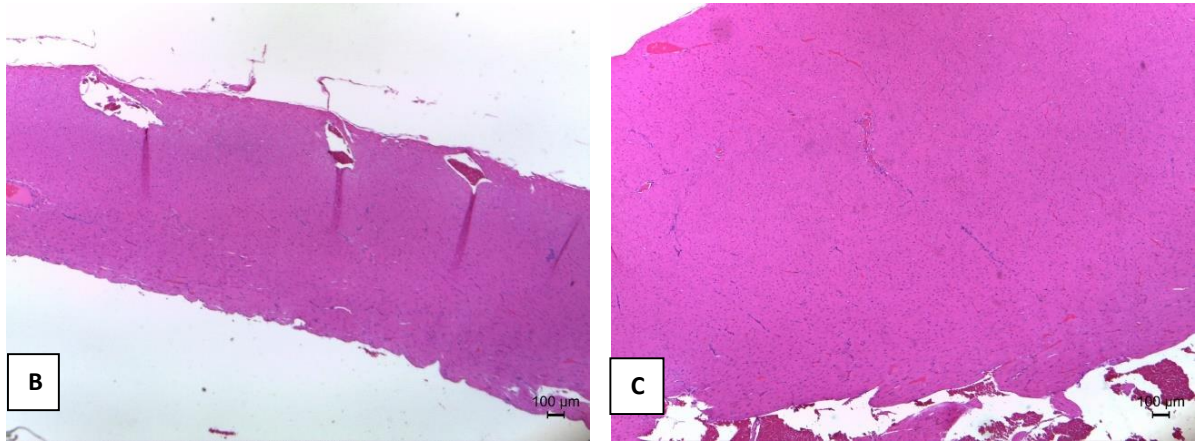
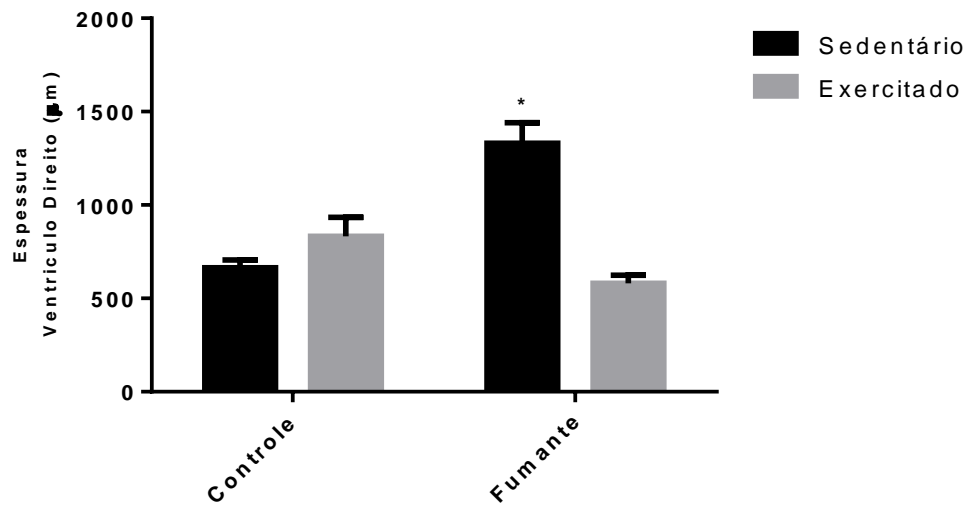




**Figura 5.** A- Espessura da artéria pulmonar; \*  $p=0,003$  vs CS e CE; \*\*  $p=0,003$  vs CS. Valores expressos em média  $\pm$  EPM ( $n=8$ /grupo). B- Avaliação histopatológica da artéria pulmonar de um animal CS, PAS-Azul de Alcian, aumento de 200x. C- Artéria pulmonar de um animal FS, PAS-Azul de Alcian, aumento 200x.

O grupo FS apresentou aumento da espessura do VD comparado a todos os grupos (Figura 6) (CS, CE e FE) ( $p<0,0001$ ). Não foram obtidos resultados significativos na avaliação de espessura do VE e septo.

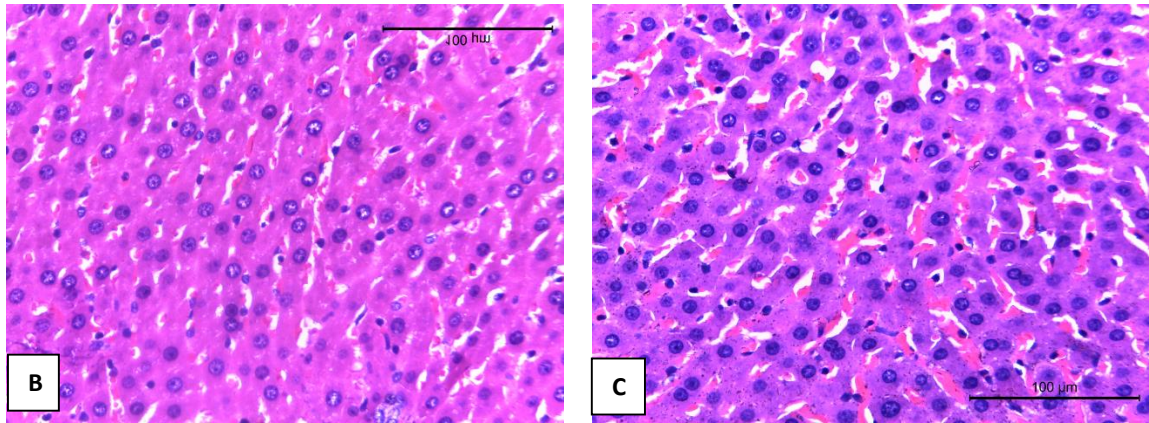
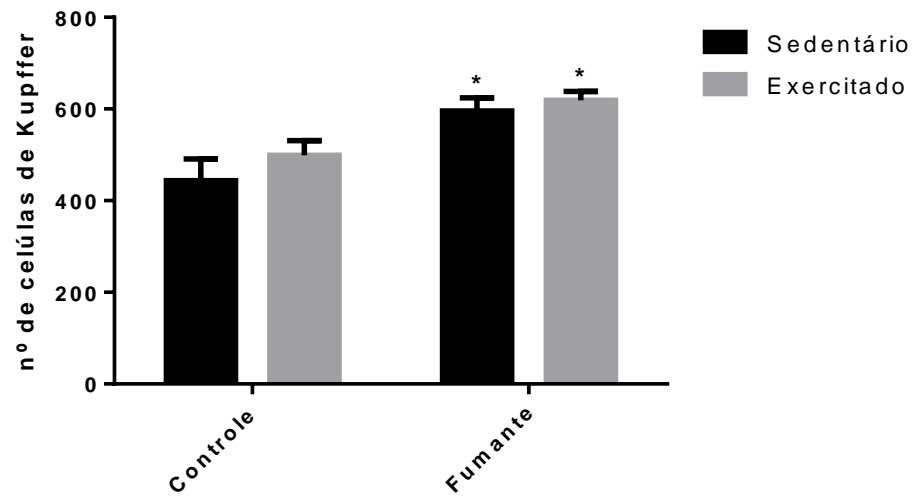
A)



**Figura 6.** A- Espessura do ventrículo direito. \*  $p < 0,0001$  vs CS, CE e FE. Valores expressos em média  $\pm$  EPM (n=8/grupo). B- Avaliação histopatológica da espessura do ventrículo direito de um animal CS, HE, aumento de 100x. C- Ventrículo direito de um animal FS, HE, aumento 100x.

No fígado, não foi observado infiltrado inflamatório, necrose, colestase e esteatose em nenhum grupo. Na contagem das células de Kupffer, houve um aumento significativo de aproximadamente 30% nos grupos fumantes (FS e FE,  $p=0,002$ ) em comparação ao CS (Figura 7).

A)

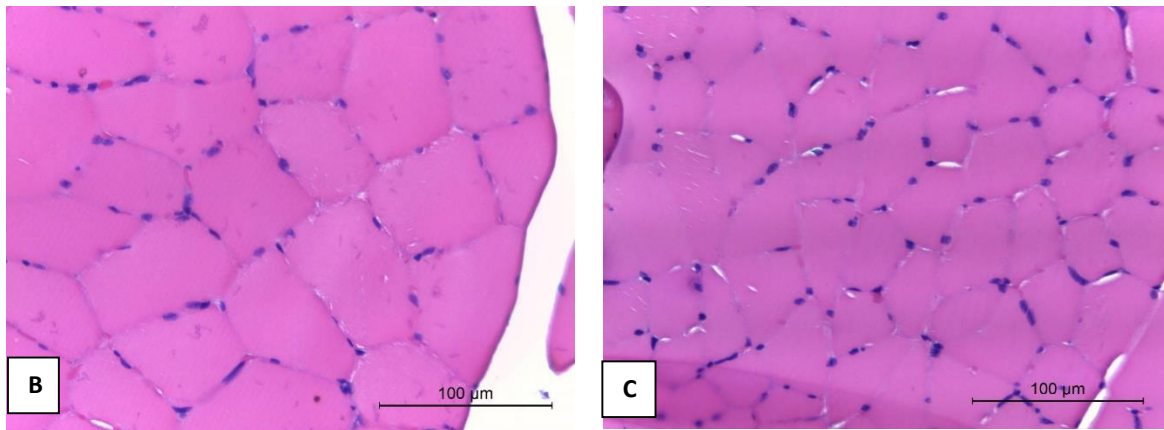
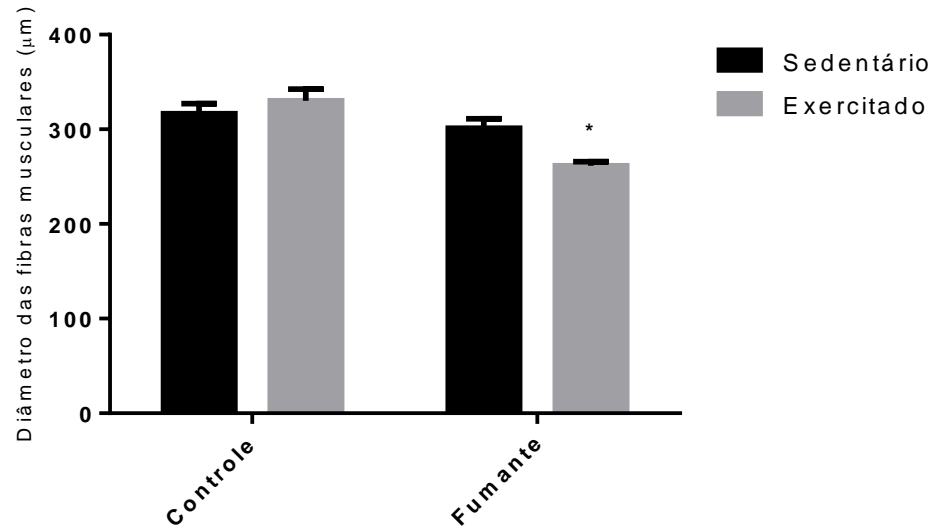


**Figura 7.** A- Número das células de Kupffer. \*  $p=0,0003$  vs CS. Valores da soma de 10 campos expressos em média  $\pm$  EPM ( $n=8$ /grupo). B- Avaliação histopatológica de fígado de um animal CS, HE, aumento de 400x. C- Fígado de um animal FS, HE, aumento 400x.



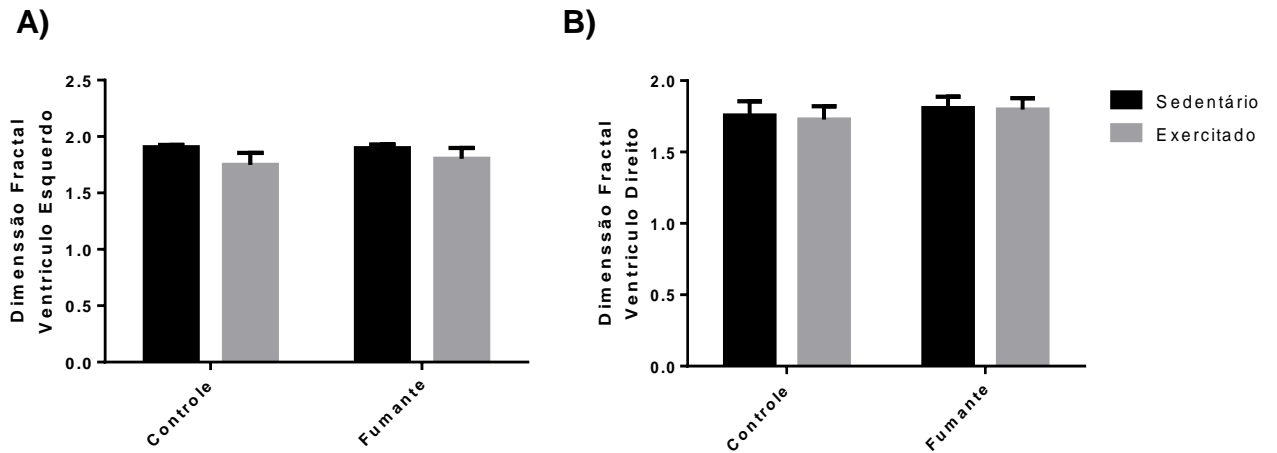
O diâmetro das fibras do músculo gastrocnêmio foi reduzido significativamente nos animais FE em comparação a todos demais ( $p=0,0002$ ) (Figura 8).

A)



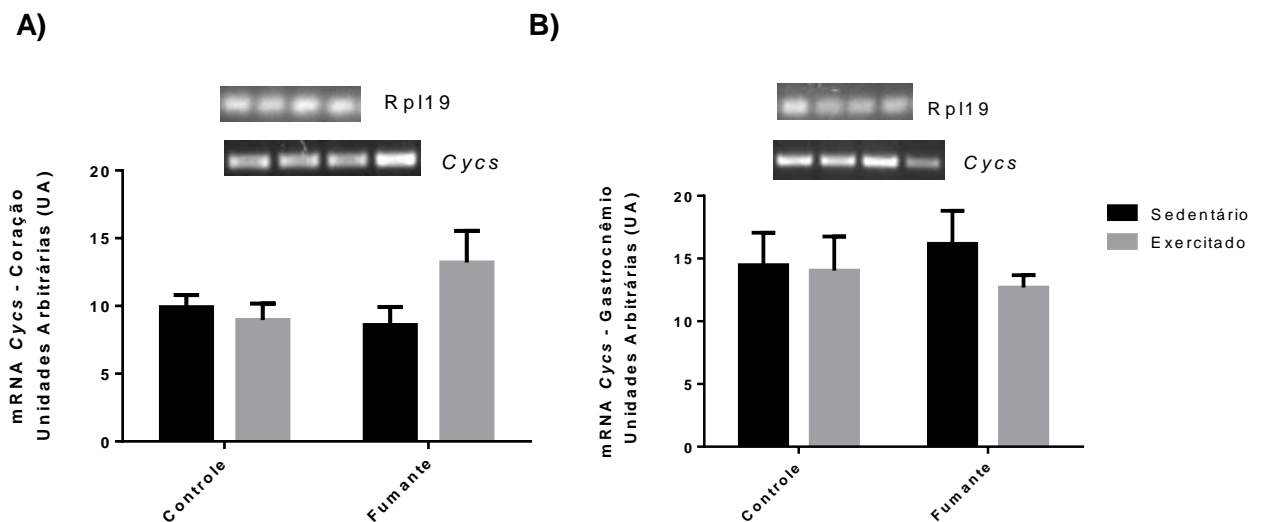
**Figura 8.** A- Diâmetro das fibras musculares. \*  $p=0,0002$  vs CS, CE e FS. Valores expressos µm/animal em média  $\pm$  EPM ( $n=8$ /grupo). B- Avaliação histopatológica do músculo gastrocnêmio de um animal CS, HE, aumento de 400x. C- Tecido muscular de um animal FS, HE, aumento 400x.

Na análise fractal, não foi observado diferença significativo entre os grupos em ambos ventrículos analisados (Figura 9).

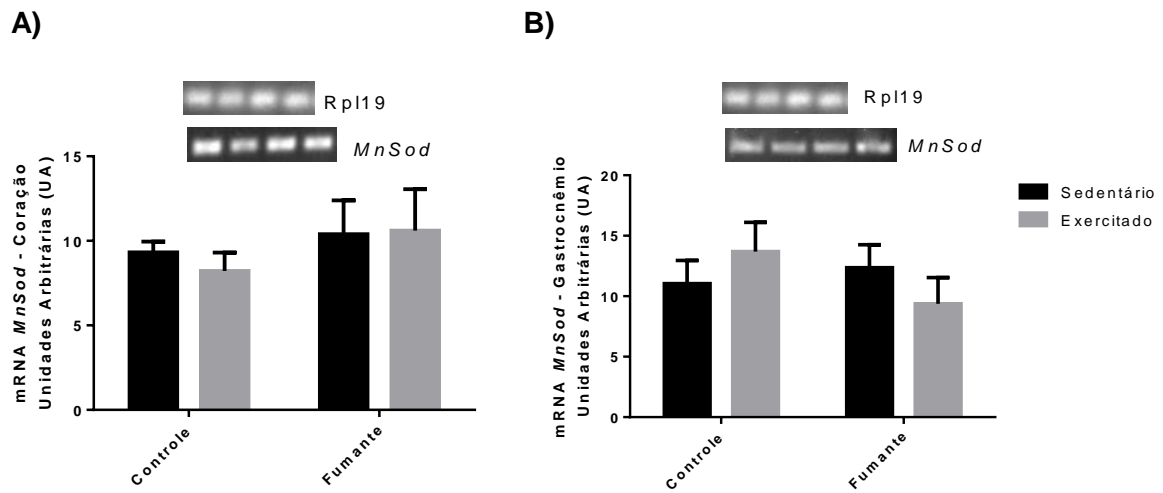


**Figura 9.** Dimensão Fractal. A- Ventrículo Esquerdo. B- Ventrículo Direito. Não houve diferença significativa, valores expressos  $\mu\text{m}/\text{animal}$  em média  $\pm$  EPM (n=8/grupo).

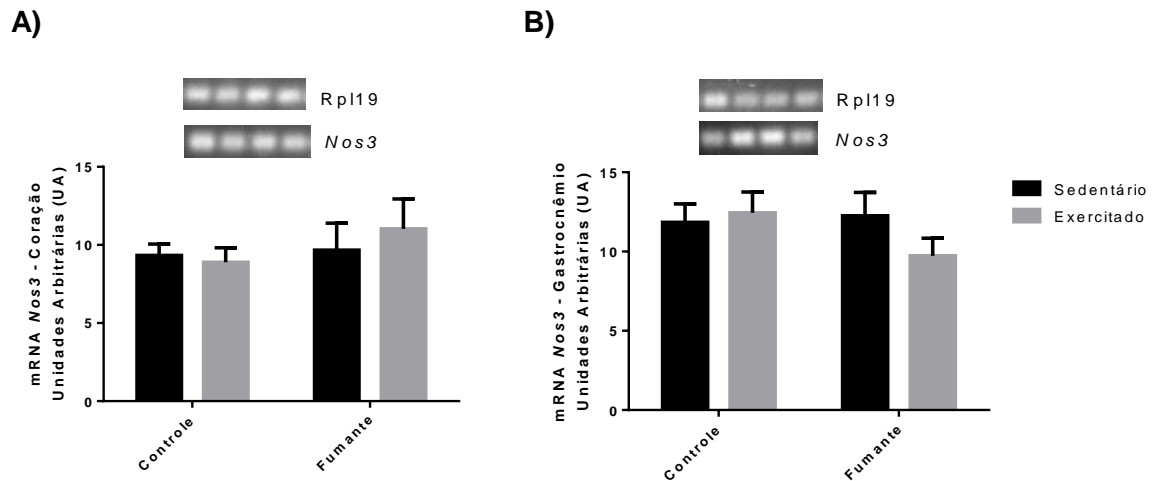
Em relação às análises de expressão gênica de marcadores da biogênese e dinâmica mitocondrial, não foi observada alterações entre os grupos nas expressões de *Cyts* (Figura 10), *MnSod* (Figura 11), *Nos3* (Figura 12), *Tfam* (Figura 13), *Nrf1* (Figura 14) e *Mfn2* (Figura 15) nem no coração nem no músculo esquelético gastrocnêmio.



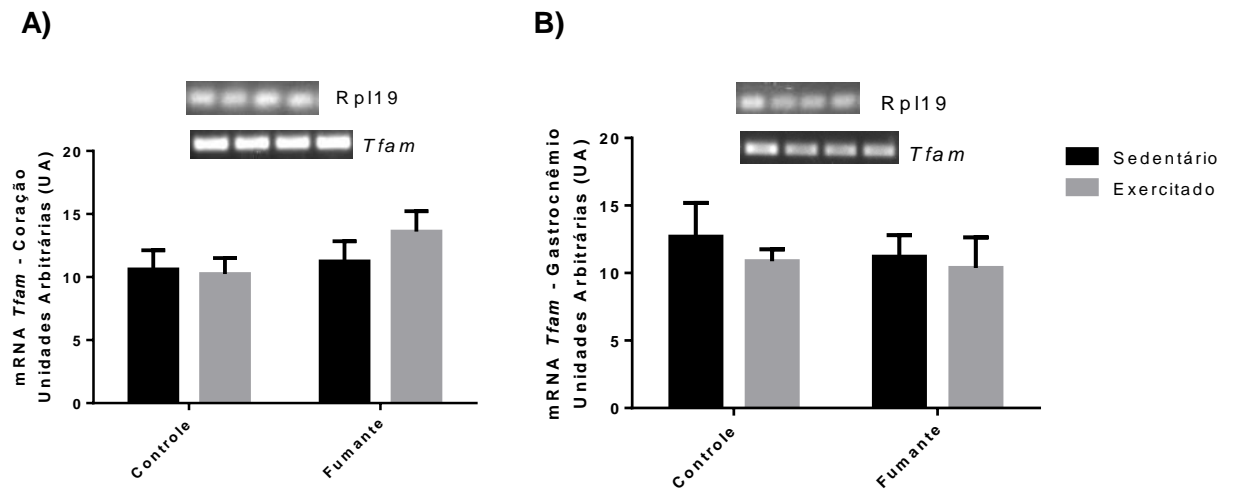
**Figura 10.** Expressão gênica de *Cyts*. A- Coração. B- Gastrocnêmio. Não houve diferença significativa. Valores expressos em unidades arbitrárias com média  $\pm$  EPM (n=8/grupo).



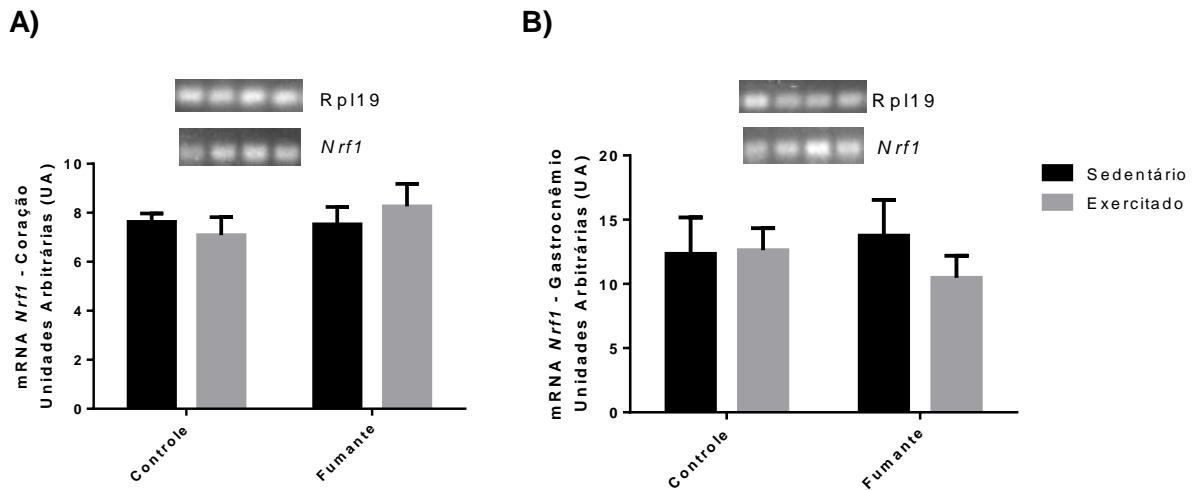
**Figura 11.** Expressão gênica de MnSod. A- Coração. B- Gastrocnêmio. Não houve diferença significativa. Valores expressos em unidades arbitrárias com média  $\pm$  EPM (n=8/grupo).



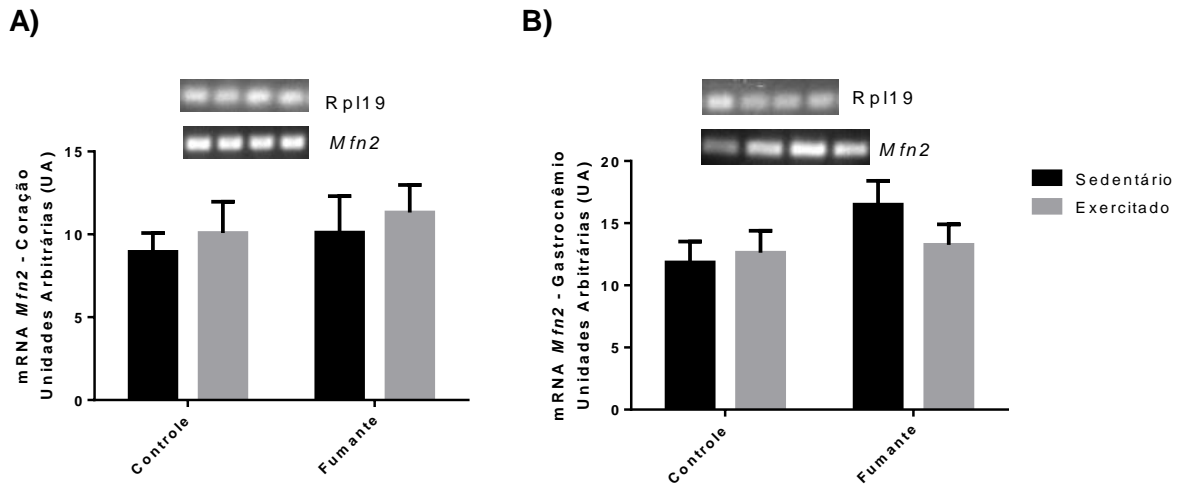
**Figura 12.** Expressão gênica de Nos3. A- Coração. B- Gastrocnêmio. Não houve diferença significativa. Valores expressos em unidades arbitrárias com média  $\pm$  EPM (n=8/grupo).



**Figura 13.** Expressão gênica de *Tfam*. A- Coração. B- Gastrocnêmio. Não houve diferença significativa. Valores expressos em unidades arbitrárias com média  $\pm$  EPM (n=8/grupo).

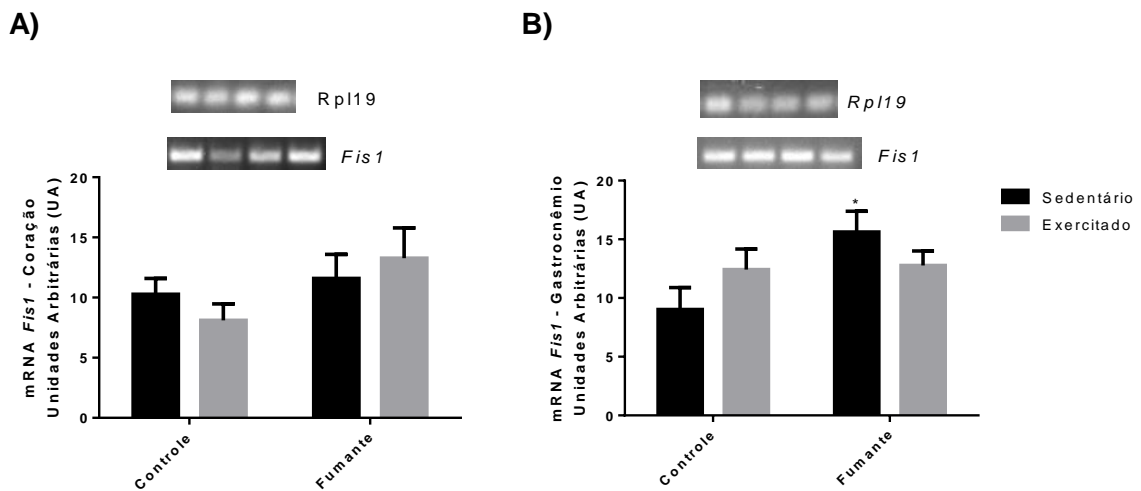


**Figura 14.** Expressão gênica de *Nrf1*. A- Coração. B- Gastrocnêmio. Não houve diferença significativa. Valores expressos em unidades arbitrárias com média  $\pm$  EPM (n=8/grupo).



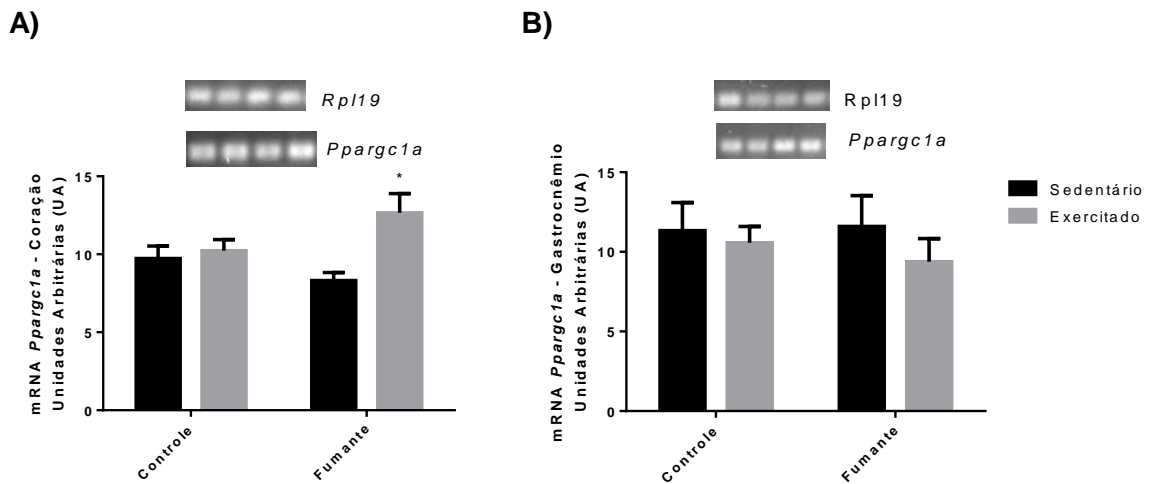
**Figura 15.** Expressão gênica de *Mfn2*. A- Coração. B- Gastrocnêmio. Não houve diferença significativa. Valores expressos em unidades arbitrárias com média  $\pm$  EPM (n=8/grupo).

Houve aumento do marcador de fissão *Fis1* nos animais FS em comparação ao grupo CS ( $p=0,05$ ) em músculo gastrocnêmio (Figura 16).



**Figura 16.** Expressão gênica de *Fis1*. A- Coração, não houve diferença significativa. B- Gastrocnêmio, \*  $p=0,05$  vs CS. Valores expressos em unidades arbitrárias com média  $\pm$  EPM (n=8/grupo).

No coração foi observado aumento da expressão do gene *Ppargc1a* nos animais FE comparados ao grupo FS ( $p=0,01$ ) (Figura 17).



**Figura 17.** Expressão gênica de *Ppargc1a*. A- Coração; \*  $p=0,01$  vs FS. B- Gastrocnêmio, não houve diferença significativa. Valores expressos  $\mu\text{m}/\text{animal}$  em média  $\pm$  EPM ( $n=8/\text{grupo}$ ).

## DISCUSSÃO

No presente estudo observamos que a exposição à fumaça secundária de cigarro diminuiu o ganho de peso corpóreo dos animais, peso do tecido adiposo, desenvolveu enfisema pulmonar, causou aumento da espessura do VD, da quantidade de macrófagos no fígado e da expressão gênica de *Fis1* no músculo gastrocnêmio. Nota-se também que a prática de TR intensificou a redução do peso corpóreo final e peso tecidual de coração e fígado, redução do consumo de ração, da concentração de HDL circulante, das fibras musculares no músculo gastrocnêmio e provocou aumento da expressão gênica de *Ppargc1a* no coração. Apesar da exposição à fumaça secundária de cigarro desenvolver aumento da espessura da artéria pulmonar em ambos grupos fumantes, observa-se que o TR preveniu o aumento na espessura do VD. Nota-se que não houve diferença na análise de densidade de colágeno cardíaco e na análise de mRNA de *Cyccs*, *MnSod*, *Tfam*, *Nos3*, *Nrf1* e *Mfn2*.

O cigarro é a principal droga lícita consumida no mundo. Calcula-se a existência de 1,2 bilhões de fumantes no mundo, estimando que uma a cada cinco pessoas possua esse hábito prejudicial <sup>(5)</sup>. Fumar, além de desenvolver dependência, está relacionado com o surgimento de diversas doenças crônicas em pulmão, coração, fígado e músculo esquelético, além de desnutrição e doenças emocionais <sup>(3,4)</sup>.

Uma revisão sistemática analisou as consequências da fumaça de cigarro no peso corporal de fumantes, concluindo que fumantes de baixa e média intensidade (até 1 maço por dia), apresentam redução significativa do peso, devido à ação da nicotina em aumentar a taxa metabólica e reduzir a absorção calórica, contribuindo também para a redução do apetite <sup>(28)</sup>. A nicotina induz um efeito anoréxico agudo, capaz de associar negativamente a fome e o consumo de alimentos com a saciedade no período de duas horas após a ingestão da nicotina, através da liberação de neurotransmissores como a Dopamina e Noraepinefrina <sup>(29)</sup>. Sabe-se que a exposição a fumaça secundária intensifica os efeitos nocivos devido à ausência do filtro, liberando concentração de nicotina e CO<sub>2</sub> três vezes maior e 50 vezes mais substâncias cancerígenas <sup>(6,7)</sup>.

Portadores de DPOC apresentam com frequência alterações nutricionais, contribuídas pelo hábito de fumar resultando em uma redução do peso ideal, além de prognósticos negativos, reduzindo a sobrevida 13 anos em média <sup>(30)</sup>. Entre os espectros de DPOC se encontra o enfisema pulmonar, caracterizado como a destruição das paredes alveolares e aumento dos espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais <sup>(31)</sup>. No presente estudo foi detectada a presença de enfisema pulmonar em ambos os grupos de fumantes, resultado semelhante ao estudo de Kozma et al <sup>(8)</sup>, que concluiu que a exposição à fumaça secundária de cigarro é capaz de desenvolver um modelo de lesão pulmonar oxidativa e inflamatória, acelerando alterações funcionais, morfológicas e limitando as trocas gasosas <sup>(32)</sup>.

O agravamento do enfisema pulmonar, prejudica a capacidade funcional do músculo, devido a redução das unidades motoras tipo I; atrofia de unidades motoras tipo I e II; capilaridade reduzida e níveis alterados de enzimas metabólicas <sup>(8)</sup>. Dessa forma a DPOC é considerado uma doença sistêmica, capaz de resultar em alterações músculo esqueléticas como fraqueza, disfunção muscular e redução do peso, decorrente de um estresse oxidativo crônico, contribuindo também para uma ingestão calórica reduzida <sup>(33)</sup>.

Pode-se afirmar que a fumaça de cigarro influencia negativamente o desenvolvimento do peso corporal, o metabolismo de aminoácidos, além de promover redução no músculo esquelético, gerando baixas concentrações de glutamato, glutamina e alanina, aminoácidos que desempenham importantes funções na gliconeogênese, reações nos músculos esqueléticos e fonte de ATP para leucócitos

e fibroblastos <sup>(33)</sup>. Além disso, o TR causa um desequilíbrio ATP:AMP e ativa a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) <sup>(34)</sup>. Sabe-se que a ativação da AMPK é responsável pela inibição da via mTOR responsável pela síntese de proteínas relacionadas com a hipertrofia muscular <sup>(35)</sup>.

Ao observarmos o resultado do presente estudo referente ao ganho de peso dos animais, percebe-se uma redução nos grupos fumantes, destacando-se o grupo FE, acompanhado de redução do peso de tecido adiposo, do coração, do fígado e do diâmetro das fibras musculares de gastrocnêmio. Sugere-se que o hábito de fumar associado à prática de TR, interfira de forma negativa no peso dos animais, associado à uma possível redução do apetite, visto que o grupo FE consumiu menos ração em comparação a todos os demais grupos. Em relação à redução do diâmetro das fibras musculares, provavelmente houve uma somatória dos malefícios desenvolvidos pelo enfisema pulmonar com o possível estresse causado pelo TR. Destaca-se que o TR deve ser realizado com cautela em fumantes.

Além das alterações musculares periféricas, a exposição ao fumo também pode causar alterações nos músculos respiratórios, responsáveis pela hiperinsuflação pulmonar, uma das características dos portadores de DPOC <sup>(36)</sup>. A hiperinsuflação pulmonar, altera a forma da parede torácica, rebaixa e reduz as fibras musculares do diafragma, fazendo com que o músculo trabalhe com um aumento da carga mecânica devido a limitação do fluxo aéreo. Dessa maneira, as alterações na estrutura do diafragma em fumantes incluem o aumento das unidades motoras tipo I e diminuição das unidades motoras tipo II, possivelmente aumentando, portanto, a capacidade oxidativa das fibras musculares deste músculo, denominando essa alteração como adaptação aeróbica do diafragma, o que é insuficiente para restabelecer a força de contração normal, podendo resultar em hipertensão pulmonar (HP) <sup>(37)</sup>.

No presente estudo, observamos aumento significativo da espessura da artéria pulmonar em ambos os grupos de fumantes. Esse resultado sugere que a hiperinsuflação pode resultar em um aumento na pressão da artéria pulmonar, com provável aumento da espessura das artérias pulmonares, característico de HP <sup>(38)</sup>. A HP consiste na elevação persistente da pressão pulmonar vascular, que pode ser causada por aumento das pressões nos segmentos venosos e arteriais da circulação pulmonar <sup>(39)</sup>. Dessa forma a HP não é uma doença específica, mas uma condição fisiopatológica. Já a hipertensão arterial pulmonar é caracterizada pela elevação



crônica da pressão da artéria pulmonar conduzindo à sobrecarga do VD, com hipertrofia e dilatação da parede livre do VD <sup>(40)</sup>. Os animais FS desenvolveram hipertensão arterial pulmonar, visto um aumento significativo na espessura do VD em comparação a todos os demais grupos. Apesar do TR não prevenir o desenvolvimento da HP, o mesmo foi capaz de prevenir o desenvolvimento de hipertensão arterial pulmonar neste modelo animal, considerando que a espessura do VD se manteve reduzido no grupo FE.

Controlada por uma crescente família de proteínas de "modelagem mitocondrial", os processos de fusão e fissão devem ocorrer em um preciso equilíbrio, para manter a dinâmica e função mitocondrial <sup>(17)</sup>. Quando há um aumento da fusão e/ou diminuição da fissão, as mitocôndrias interligadas recebem uma forma alongada, enquanto um decréscimo na fusão e/ou aumento da fissão, a mitocôndria assume formatos puntiformes e fragmentadas <sup>(41)</sup>. Foi observado um aumento na expressão gênica de *Fis1* (sugerindo aumento de fissão), não acompanhado do aumento na expressão de *Mfn2* ( *fusão*) nos grupos FS. Sabe-se que portadores de DPOC e a exposição à fumaça secundária do cigarro aumentando produção de EROs e inflamação hipóxica em diversos tecidos <sup>(42)</sup>. Mitocôndrias puntiformes e fragmentadas são isoformas de mitocôndrias inativas ou que não realizam sua função de forma eficiente, assim o hábito de fumar associado com o sedentarismo contribuiu para um desequilíbrio entre a fissão e fusão mitocondrial em músculo esquelético neste modelo.

Marsboom et al <sup>(43)</sup>, observou em seu estudo que o *knockout* de proteínas da fissão mitocondrial em músculo liso da artéria pulmonar preveniu o desenvolvimento de hipertensão arterial pulmonar. Resultado semelhante ao do presente estudo, que observou o aumento da expressão gênica de hFis1 e o desenvolvimento de hipertensão arterial pulmonar em um mesmo grupo, o FS. No entanto, apesar do aumento da espessura do VD no grupo FS, não houve alteração da densidade de colágeno cardíaco nos grupos através da análise fractal. Sugere-se que o tempo de 16 semanas não foi suficiente para gerar alteração na densidade de colágeno cardíaco, porém devido ao aumento da espessura do VD nos animais FS, a longo prazo há o risco de remodelação cardíaca nos mesmos, como já observado em estudos prévios da literatura <sup>(40)</sup>.

O TR aumenta o cálcio sarcoplasmático incentivando a transcrição dos genes nas fibras glicolíticas, responsivas à proteína Calmodulina e ativação do Pgc-1 $\alpha$  (44,45). O aumento de Pgc-1 $\alpha$  devido ao TR crônico induz melhora da capacidade oxidativa, direciona o fenótipo de fibras lentas e oxidativas, aumenta a biogênese mitocondrial e o transporte de GLUT4 em tecido muscular (45). Um estudo verificou que animais com *knockout* de PGC-1 $\alpha$  no coração, tiveram uma redução da biogênese mitocondrial, decréscimo no fornecimento de ATP e redução da contratilidade muscular (46).

No presente estudo foi observado o aumento da expressão gênica de *Ppargc-1a*, gene que codifica a proteína PGC-1 $\alpha$ , no coração dos animais FE, podendo sugerir um resultando benéfico na capacidade oxidativa e função muscular. Estudos já relacionam o aumento de Pgc-1 $\alpha$  como mecanismo eficiente e capaz de reduzir os malefícios de doenças crônicas (44,47). O grupo FE apresentou redução significativo do VD em comparação ao grupo FS, grupo que apresentou redução do gene e aumento de *hFis1*. Embora não tenha sido avaliado o conteúdo protéico de PGC1- $\alpha$ , é possível que a elevada expressão do gene do PGC1- $\alpha$  possa ter se refletido em elevada quantidade de proteína, o que poderia contribuir para um melhor funcionamento muscular cardíaco, melhor contratilidade do miocárdio, com positiva capacidade oxidativa, prevenindo a sobrecarga do VD e conseqüentemente não desenvolvendo hipertensão arterial pulmonar em ratos fumantes.

A definição básica para sistema imunológico, é a proteção contra agentes infecciosos. Os mecanismos de defesa contra microrganismos são divididos em duas grandes categorias, a imunidade inata (refere-se aos mecanismos que estão prontos para agirem contra infecções mesmo antes delas ocorrerem, como exemplo os macrófagos), e imunidade adaptativa (refere-se aos mecanismos estimulados por microrganismos capazes de reconhecer substâncias de origem microbiana e não microbiana, como exemplo os linfócitos) (48). Ao analisarmos o aumento de macrófagos hepáticos nos grupos fumantes (FS e FE), notamos que apesar de não apresentarem esteatose e infiltrado inflamatório no fígado, houve a ação do sistema imunológico inato, que está sempre presente pronto para defender contra microrganismos e eliminar células danificadas (49), neste caso provavelmente lesadas pela exposição à fumaça secundária do cigarro.

Durante a resposta da imunidade inata, os macrófagos são uma das células responsáveis pelo transporte de colesterol <sup>(50)</sup>. Um aumento de macrófagos em regiões com aumento de EROs (situação predisposta ao fumo), pode resultar na formação de células espumosas, devido a fagocitose de LDL oxidado. O aumento da célula espumosa causa aumento de LDL e efluxo de HDL, desenvolvendo alterações composicionais, convertendo o HDL em uma forma disfuncional, não capaz de mediar eficientemente o efluxo de colesterol, podendo iniciar um processo pró-inflamatório <sup>(50)</sup>. Além disso pode resultar na migração das células musculares lisas para região extracelular desenvolvendo um quadro de aterosclerose, comum em fumantes, responsável pelo infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico. Foi observado redução de HDL e aumento de macrófagos no fígado do grupo FE. Além disso, o grupo FS também apresentou aumento de macrófago no fígado, sugerindo uma possível redução de HDL à longo prazo.

Estudos com intervenções em ciclos invertidos, avaliação da expressão de proteínas codificadas pelos genes estudados, avaliação de proteínas de vias de síntese proteolítica AMPK e Akt/mTOR, possível identificação do perfil de macrófagos presentes, análise de EROs poderiam contribuir para melhor compreensão dos mecanismos do TR neste modelo de tabagismo.

O presente estudo mostrou que a associação da exposição à fumaça secundária de cigarro com o sedentarismo, favoreceu o possível desequilíbrio na expressão gênica de fissão e fusão mitocondrial em músculo esquelético, o aumento de espessura do VD com desenvolvimento de hipertensão arterial pulmonar. Por outro lado, a prática de TR reverteu este quadro, com aumento da expressão do gene de *Ppargc1a* (marcador fundamental da biogênese mitocondrial) no coração e prevenção do aumento da espessura do VD, conseqüentemente, do desenvolvimento da hipertensão arterial pulmonar. Vale ressaltar que o TR associado à exposição à fumaça secundária de cigarro não preveniu o desenvolvimento de enfisema pulmonar e hipertrofia da artéria pulmonar, provocou redução no consumo alimentar, no peso corpóreo final e tecidual, bem como redução das fibras musculares e níveis de HDL circulantes nos animais. Esses dados mostram que apesar dos benefícios do TR é necessária muita cautela na intensidade de seu emprego em fumantes, sugerindo a necessidade de estudos adicionais nesta categoria.

Portanto, conclui-se que embora não tenha prevenido Enfisema e HP, o TR em ratos fumantes preveniu hipertensão arterial pulmonar possivelmente por melhorar a capacidade oxidativa do músculo cardíaco (aumento de *Ppargc1a*), o que poderia resultar na prevenção do aumento do VD. Entretanto, resultados negativos foram encontrados na ingestão e peso corporal, músculo esquelético (redução do diâmetro das fibras) e no perfil de lipoproteínas (redução do HDL).

## REFERÊNCIAS

1. Muakad IB. Tabagismo: maior causa evitável de morte do mundo. R. Fac. Dir. Univ. São Paulo. 2014; 109:527-558.
2. Cecil TL, Brewer TM, Young M, Holman MR. Acrolein yields in mainstream smoke from commercial cigarette and little cigar tobacco products. Nicotina Tob Res. 2018;19(7):865-870.
3. Okamoto M, Miyake T, Kitai K, Furukawa S, Yamamoto S, Senba H, et al. O tabagismo é um fator de risco para o aparecimento de doença hepática gordurosa em não-diabéticos: um estudo de coorte longitudinal. PloS um. 2018;13(4) e 0195147.
4. Lee HW, Park SH, Weng MW, Wang HT, Huang WC, Lepor H, et al. E-cigarette smoke damages DNA and reduces repair activity in mouse lung, heart, and bladder as well as in human lung and bladder cells. Proc Natl Acad Sci EUA A. 2018;115(7): E1560-E1569.
5. World Health Organization (WHO). The World Health Report: World No Tobacco Day: Tobacco and Heart Disease, 2018.
6. Frazer K, Callinan JE, McHugh J, van Baarsel S, Clarke A, Doherty K, et al. Legislative smoking bans for reducing harms from secondhand smoke exposure, smoking prevalence and tobacco consumption. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2016;(2).
7. Araújo AJD, Menezes AMB, Dórea AJPS, Torres BS, Viegas CADA, Silva CARD, et al. Diretrizes para cessação do tabagismo. J Bras Pneumol. 2004; 30:1-76.
8. Kozma RDLH, Alves EM, Barbosa OVA, Lopes FDTQD, Guardia RC, Buzo HV, et al. A new experimental model of cigarette smoke-induced emphysema in Wistar rats. J. bras. pneumol. 2014;40(1).
9. Vij N, Shivalingappa CP, Van Westphal C, Hole R, Bodas M. Cigarette smoke-induced autophagy impairment accelerates lung aging, COPD-emphysema exacerbations and pathogenesis. AJP Cell. 2016;314(1):C73-C87.
10. da Silva Oliveira G, Antunes MD, da Cunha Leme DE, de Oliveira DV. Quais tipos de exercícios físicos devem ser prescritos na doença pulmonar obstrutiva crônica?. Rev Med Saude Brasília. 2018;7(1).

11. Ryrso CK, Thaning P, Siebenmann C, Lundby C, Lange P, Pedersen BK, et al. Effect of endurance versus resistance training on local muscle and systemic inflammation and oxidative stress in COPD. *Scand J Med Sci Sports*. 2018.
12. Groennebaek T, Vissing K. Impact of resistance training on skeletal muscle mitochondrial biogenesis, content, and function. *Front. Physiol*. 2017; 8: 713.
13. PEREIRA B. Mitochondrial biogenesis and physical exercise: electric-transcriptional coupling hypothesis. *Rev. bras. educ. fís. Esporte*. 2015; 29(4), 687-703.
14. Schoenfeld BJ, Peterson MD, Ogborn D, Contreras B, Sonmez GT. Effects of low- vs. high-load resistance training on muscle strength and hypertrophy in well-trained men. *J Strength Cond Res*. 2015; 29(10), 2954-2963.
15. Andersson U, Scarpulla RC. Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *MCB*. 2001; 21(11), 3738-3749.
16. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *MBC*. 2005; 25(4), 1354-1366.
17. Lee S, Jeong SY, Lim WC, Cho H. Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(31), 22977-22983.
18. Schneider CD, Oliveira ARD. Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev Bras Med Esporte*. 2004; 10(4), 308-313.
19. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*. 2014; 224, 164-175.
20. de Vasconcelos TB, Cardoso ARNR, Josino JB, Macena RHM, Bastos VPD. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?. *Journal of Health Sciences*. 2015; 16(3).
21. Foureaux G, Pinto KMDC, Dâmaso A. Effects of excess post-exercise oxygen consumption and resting metabolic rate in energetic cost. *Rev Bras Med Esporte*. 2006; 12(6), 393-398.
22. Barroso R, Tricoli V, Ugrinowitsch C. Adaptações neurais e morfológicas ao treinamento de força com ações excêntricas. *R. bras. Ci. e Mov*. 2005; 13(2): 111-122.
23. Lopes FL, Perreira FM, Reboredo MM, Castro TM, Vianna JM, Novo Jr JM, et al. Redução da variabilidade da frequência cardíaca em indivíduos de meia-idade e o efeito do treinamento de força. *Rev. bras. fisioter*. 2007;11(2), 113-119.
24. Ebersbach Silva P, Alves T, Fonseca ATS, Oliveira MADN, Machado UF, et al. Cigarette smoke exposure severely reduces peripheral insulin sensitivity without

changing GLUT4 expression in oxidative muscle of Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013;57(1):19-26.

25. Gomes PRL, Seraphim, PM. Efeito da exposição à fumaça de cigarro durante a prenhez e a lactação de ratas e sua prole sobre parâmetros séricos e morfométricos. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2010; 32(12):591-6.

26. Kamiide Y, Furuya M, Inomata N, Yada T. Chronic exposure to cigarette smoke causes extrapulmonary abnormalities in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;39(2):864-870.

27. Leite RD, Durigan RC, de Souza LAD, de Souza CMV, Souza Md, Selistre-de-Araújo HS, et al. Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. *Metabolism.* 2013;62(10):1477-1484.

28. Chiolero A, Faeh D, Paccaud F, Cornuz J. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. *Am J Clin Nutr.* Abril de 2008;87(4):801-9.

29. Audrain McGovern J, Benowitz NL. Cigarette smoking, nicotine, and body weight. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2011;90(1),164-168.

30. Schols AM, Slangen J, Volovics L, Wouters EF. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(6 Pt 1):1791-97.

31. Dourado VZ, Tanni SE, Vale SA, Faganello MM, Sanchez FF, Godoy I. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol.* 2006;32(2):161-71.

32. Ribeiro-Paes JT, Stessuk T, de las Heras KR. Cell Therapy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: State of the Art and Perspectives. *Rijeka: InTech.* 2012;455-74.

33. Kirkpatrick A, Goyal A, Radovanovic D, Kolli S, Butler J, Jelinek C, et al. Catabolic-Anabolic Status And Peripheral Muscle Wasting Detected By Ultrasound Imaging In COPD. In B56. 2016;A4010.

34. Salvi AM, DeMali KA. Mechanisms linking mechanotransduction and cell metabolism. *Current opinion in cell biology.* 2018;54,114-120.

35. Vissing K, McGee SL, Farup J, Kjolhede T, Vendelbo MH, Jessen N. Differentiated mTOR but not AMPK signaling after strength vs endurance exercise in training-accustomed individuals. *Scandinavian journal of medicine & science in sports.* 2013;23(3),355-366.

36. Langer D, Ciavaglia CE, Faisal A, Webb KA, Neder JA, Gosselink R, et al. Inspiratory muscle training reduces diaphragm activation and dyspnea during exercise in COPD. *J Appl Physiol.* 2018;125(2):381-392.

37. Ceco E, Weinberg SE, Chandel NS, Sznajder JI. Metabolism and skeletal muscle homeostasis in lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;57(1):28.

38. Noordegraaf AV, Westerhof BE, Westerhof N. The relationship between the right ventricle and its load in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 69(2):236-243.
39. Ike D, Jamami M, Marino DM, Ruas G, Pessoa BV, et al. Efeitos do exercício resistido de membros superiores na força muscular periférica e na capacidade funcional do paciente com DPOC. *Fisioter Mov*. 2017;23(3).
40. Giordano J, Khung S, Duhamel A, Hossein-Foucher C, Bellèvre D, Lamblin N, et al. Lung perfusion characteristics in pulmonary arterial hypertension (PAH) and peripheral forms of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (pCTEPH): dual-energy CT experience in 31 patients. *Eur Radiol*. 2017 abr; 27 (4): 1631-1639.
41. Pernas L, Scorrano L. Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function. *Annual review of physiology*. 2016; 78, 505-531.
42. Wiegman CH, Michaeloudes C, Haji G, Narang P, Clarke CJ, Russell KE, et al. Oxidative stress–induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015; 136(3), 769-780.
43. Marsboom G, Toth PT, Ryan JJ, Hong Z, Wu X, Fang YH, et al. Dynamin-related protein 1–mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a novel therapeutic target in pulmonary hypertension. *Circulation research*. 2012;111.
44. Machado J, Krinski K, Elsangedy HM, Cieslak F, Lopes G, Gomes ARS. Vias de sinalização intracelular na atrofia muscular e no treinamento resistido. *Fisio em Movimento*. 2017; 22(3).
45. Ahtiainen JP. Physiological and Molecular Adaptations to Strength Training. In *Concurrent Aerobic and Strength Training*. Springer, Cham, 2019; 51-73.
46. Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell metabolism*. 2005;1(4), 259-271.
47. Persson BNJ. On the fractal dimension of rough surfaces. *Tribol Lett*. 2014;54(1):99-106.
48. Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature*. 2016;535(7610):65.
49. Bhat TA, Kalathil SG, Bogner PN, Miller A, Lehmann PV, Thatcher TH, et al. Secondhand smoke induces inflammation and impairs immunity to respiratory infections. *J Immunol*. 2018;200(8):2927-2940.
50. Kelly B, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res*. 2015; 25 (7): 771-84.

## ANEXO 1

## Certificado da Comissão de ética no uso de animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Presidente Prudente

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada **"Efeito da Exercício Físico Resistidos sobre a Expressão Gênica e Conteúdo Proteico Mitocondrial e Endotelial em Coração e Músculo Esquelético de Ratos Fumantes"**, protocolo nº **02/2017** sob responsabilidade de **Patrícia Monteiro Seraphim** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata ( exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal ( CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUAS da Faculdade de Ciência e Tecnologia da UNESP, campus de Presidente Prudente, em reunião de **30/06/2017**.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Agosto de 2017 a Janeiro de 2019
Espécie/linhagem/raça	Rato Heterogênico/ Wistar
Nº de Animais	32
Peso/idade	200g/ 45 dias
Sexo	macho
Origem	Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

  
Prof. Dr. Raul Antonio Fragoso Neto  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais.

Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
Rua Roberto Simonsen, 305 - CEP 19060-500 - Presidente Prudente - SP  
Tel (18) 3229-5315 - fax (018) 3229-5498 ou (018) 3229-5303 ceua@fct.unesp.br