

Efeitos do Exercício Aeróbio no Músculo Esquelético de Ratos Expostos à Fumaça de Cigarro

CIÊNCIAS DO EXERCÍCIO
E DO ESPORTE



Artigo Original

Effects of Aerobic Exercise on the Skeletal Muscle of Rats Exposed to Cigarette Smoke

José Carlos Silva Camargo Filho^{1,2}
Bruna Corral Garcia³
Fábio Yoshikazu Kodama³
Mariana Rotta Bonfim³
Luiz Carlos Marques Vanderlei^{1,2}
Ercy Mara Cípulo Ramos^{1,2}
Regina Celi Trindade Camargo¹
Susimary Aparecida Trevisan Padulla¹
Juliana Kimie Maeda⁴

1. Docente do Departamento de Fisioterapia da FCT/UNESP – Campus de Presidente Prudente.
2. Docente do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da FCT/UNESP – Campus de Presidente Prudente.
3. Discente do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da FCT/UNESP – Campus de Presidente Prudente.
4. Fisioterapeuta Graduada pela FCT/UNESP – Campus de Presidente Prudente.

Correspondência:

Departamento de Fisioterapia da Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP – Campus de Presidente Prudente
Rua Roberto Simonsen, 305
19060-900 – Presidente Prudente, SP
E-mail: camargo@fct.unesp.br

RESUMO

Introdução: Os fumantes sofrem redução da massa muscular e da resistência à fadiga e possivelmente a prática de atividade física contribua positivamente neste quadro. **Objetivo:** Este estudo teve por objetivo analisar as adaptações da musculatura esquelética frente à interação da prática de atividade física e exposição à fumaça de cigarro. **Métodos:** 32 ratos machos foram divididos em grupos expostos à fumaça de cigarro, exercitados (G1) e sedentários (G3), e não expostos à fumaça, exercitados (G2) e sedentários (G4). A exposição à fumaça foi realizada mediante combustão de 10 cigarros em uma câmara de inalação durante 30 minutos, duas vezes ao dia, cinco dias por semana, durante 15 dias; o exercício aeróbio foi composto por sessões diárias de 60 minutos de caminhada em esteira, cinco dias por semana. Após o sacrifício, o músculo sóleo foi coletado e seus cortes foram corados pela técnica de HE e submetidos ao método histoquímico NADH-TR. **Resultados:** O grupo G1 apresentou maior quantidade de alterações musculares, bem como ausência de atividade enzimática, o mesmo ocorrendo no G3, porém com menor intensidade; no G2 foi observado padrão normal para fibras exercitadas, estando as fibras do G4 preservadas. Quanto à morfometria, houve diferença significativa para o fator exercício ($p = 0,007$), enquanto não foram observadas diferenças significantes para o fator exposição à fumaça ($p = 0,668$) e para a interação exposição à fumaça e exercício ($p = 0,077$). **Conclusão:** A interação entre inalação de fumaça de cigarro e exercício, realizada durante 15 dias em ratos machos Wistar adultos, acentuou as alterações histológicas do músculo sóleo, levando a uma alteração da atividade enzimática e acarretando em aumento do diâmetro das fibras musculares.

Palavras-chave: tabaco, exercício, sistema musculoesquelético, histologia.

ABSTRACT

Introduction: Smokers have a reduction in the muscle mass and in the fatigue resistance and, possibly, physical activity practice contributes positively to this state. **Objective:** This study had as objective to analyze the adaptations of the skeletal musculature to the interaction between physical activity practice and cigarette smoke exposure. **Methods:** 32 male rats were divided in groups exposed to the cigarette smoke, exercised (G1) and sedentary (G3), and not exposed to cigarette smoke, exercised (G2) and sedentary (G4). The exposure to the smoke was done by the combustion of 10 cigarettes in an inhalation camera during 30 minutes, twice a day, five days per week, during 15 days; the aerobic exercise consisted of daily walking sessions of 60 minutes on treadmill, once a day, five days per week. After sacrifice, soleus muscle was obtained and its cuts were stained by HE technique and submitted to the histochemical method of NADH-TR. **Results:** Group G1 presented more muscle alterations, and also lack of enzymatic activity, the same occurring in G3, but with less intensity; G2 presented normal pattern to exercised fibers, being the fibers of G4 preserved. Regarding the morphometry, there was significant difference for the exercise factor ($p = 0.007$), while no significant differences were observed for the smoke exposure factor ($p = 0.668$) and for the interaction of exposure to smoke and exercise ($p = 0.077$). **Conclusion:** The interaction between cigarette smoke exposure and physical activity during 15 days in male wistar adult rats, accentuated the histological changes in the soleus muscle, causing an alteration in the enzymatic activity and increase in the fiber diameter.

Keywords: tobacco, exercise, musculoskeletal system, histology.

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde⁽¹⁾, existem mais de 100 bilhões de fumantes em todo o mundo, sendo que as baixas taxas e custos do cigarro contribuem para a continuidade do vício. No século XX, o tabagismo foi responsável por cerca de 100 milhões de mortes; atualmente, ocorrem cerca de 5,4 milhões de mortes anuais em de-

corrência do fumo e estima-se que em 2030 ocorrerão mais de oito milhões, das quais mais de 80% serão em países desenvolvidos.

De maneira geral, esta alta incidência de mortes é consequência das inúmeras patologias associadas à ação prejudicial dos componentes químicos inalados do cigarro, os quais são responsáveis pelo desenvolvimento de faringites, bronquites, enfisema pulmonar, diversos tipos

de câncer, sobretudo do pulmão, e doenças cardiovasculares como coronariopatias e infarto do miocárdio, entre outras⁽¹⁾.

O uso frequente do cigarro está associado a uma redução da massa muscular esquelética, reduzindo principalmente a secção transversa das fibras oxidativas⁽²⁾ e, conseqüentemente, a resistência à fadiga dos indivíduos^(3,4). Ao considerar que a preservação da massa muscular é de fundamental importância para a realização das atividades de vida diária, tal quadro pode influenciar negativamente a qualidade de vida dos fumantes.

Em decorrência destas alterações associadas ao tabaco, atualmente várias alternativas são propostas com a finalidade da interrupção do hábito de fumar, sendo a prática de exercícios físicos uma delas. Estudos^(5,6) indicam que a prática de atividade física está associada à redução dos sintomas de abstinência do fumo, bem como da vontade de fumar, servindo como uma distração dos sentimentos e pensamentos estressantes, reduzindo a ansiedade.

Por outro lado, a prática de atividade física também está associada à ocorrência de adaptações na musculatura esquelética, as quais incluem modificações nas suas características metabólicas e estruturais, com hipertrofia do tecido fino conectivo, modificações nos tipos de fibras, ampliação da relação volume/densidade mitocondrial, das enzimas oxidativas, da densidade capilar, bem como hipertrofia e hiperplasia de fibras musculares⁽⁷⁻⁹⁾.

Portanto, se forem considerados os efeitos adaptativos da musculatura esquelética frente ao exercício, espera-se que um fumante que pratique atividade física se beneficie destas adaptações, ao mínimo preservando sua massa muscular. Entretanto, não existem evidências conclusivas das adaptações musculares frente à interação de exercícios físicos e de componentes químicos contidos na fumaça de cigarros, o que torna um ponto questionável na prática clínica.

Nesse sentido, o objetivo do estudo foi analisar as alterações histológicas, histoquímicas e morfométricas nas fibras do músculo sóleo de ratos submetidos a exercício físico aeróbio associado à exposição à fumaça de cigarro.

MÉTODOS

Para a realização dos experimentos foram utilizados 32 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com idades entre 90 a 100 dias, os quais foram alojados em gaiolas plásticas coletivas. Os animais permaneceram no biotério sob temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas, com o ciclo claro iniciando-se às 7:00h. Foram alimentados com ração padrão (Supralab®, Supra Alisul Alimentos S/A, Brasil) e água, fornecidos *ad libitum*.

Todo o protocolo experimental obedeceu aos "Princípios Éticos na Experimentação Animal", adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP sob nº 121/2006.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de oito animais, sendo: G1, expostos à fumaça de cigarro e exercitados; G2, não expostos à fumaça e exercitados; G3, expostos à fumaça e sedentários; e G4, não expostos à fumaça e sedentários.

Para exposição dos animais à fumaça do cigarro, foi utilizada uma câmara de inalação construída com base nos experimentos de Cendon⁽¹⁰⁾. Esta câmara é constituída por uma caixa com estrutura de alumínio e vidro (100 x 44 x 44cm) hermeticamente fechada, dividida em dois compartimentos por um tabique de vidro escuro com cinco pertuitos de uma polegada de diâmetro. Um dos compartimentos é utilizado para a queima de cigarros, os quais foram dispostos em um suporte de madeira, e o outro para acomodação de oito animais, os quais ficaram

dentro de uma gaiola. No compartimento de queima de cigarros foi conectada uma fonte de ar comprimido com um fluxo de 10l/min, que permite a combustão dos cigarros e a condução da fumaça para o compartimento de exposição. Este, por sua vez, contém um orifício de drenagem de ar, por onde foi feita a exaustão.

O protocolo de exposição à fumaça de cigarro foi constituído por duas fases, adaptação e a exposição propriamente dita. Na adaptação, os animais do G1 e G3 foram expostos à queima de dois cigarros por 30 minutos, duas vezes ao dia, por cinco dias. Na segunda fase, os animais foram expostos à fumaça da combustão de 10 cigarros, com duração de 30 minutos⁽¹⁰⁻¹²⁾, duas vezes ao dia, perfazendo um total de 20 cigarros ao dia. Tal procedimento foi realizado cinco dias semanais, durante 15 dias. Os animais dos grupos G2 e G4, por sua vez, foram expostos a ar comprimido, seguindo-se o mesmo protocolo acima descrito.

O cigarro utilizado foi adquirido comercialmente, produzindo em cada queima (segundo o fabricante): 0,7mg de nicotina, 8mg de alcatrão e 9mg de monóxido de carbono. A escolha deste produto deveu-se ao seu baixo custo no mercado e por ser uma marca de grande adesão entre os fumantes.

O protocolo de treinamento foi realizado em esteira rolante para animais de pequeno porte, sempre no período da manhã e após a exposição à fumaça de cigarro. Os animais dos grupos G1 e G2 foram submetidos a cinco dias de adaptação, com sessões de cinco, 15, 30, 45 e 60 minutos; posteriormente, foram realizadas sessões de exercício em esteira rolante de 60 minutos diários, cinco vezes por semana, durante 15 dias, a uma velocidade de 9,75 metros por minuto, totalizando 585 metros a cada sessão de 60 minutos⁽¹³⁾.

Após 24 horas da última sessão, os animais foram sacrificados por meio de *overdose* do anestésico pentobarbital sódico via intramuscular. Subseqüentemente, o músculo sóleo foi retirado do membro pélvico direito, sendo seus fragmentos congelados pelo sistema de imersão em N-Hexana resfriada a -70°C , e armazenados em um botijão de Nitrogênio a -182°C ⁽¹³⁾. A microtomia foi realizada em micrótomo criostato (HM 505 E Microm, Alemanha) seguindo-se as técnicas e cuidados adequados.

As lâminas foram confeccionadas com cortes de $8\mu\text{m}$ e coradas pelo método hematoxilina-eosina (HE)⁽¹³⁾, e foram utilizadas para avaliação das seguintes características morfológicas: forma, posição dos núcleos, infiltrado inflamatório, presença de processo fagocítico e presença de necrose⁽¹⁴⁾. Foram também utilizadas para mensuração do menor diâmetro de 120 fibras por animal, por meio de sistema de análise de imagem computadorizada utilizando-se o *software Image Pro-Plus* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), seguindo-se os critérios previamente estabelecidos na literatura⁽¹³⁾. A demonstração da atividade de nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazólio redutase (NADH-TR), que indica a presença da atividade oxidativa, foi utilizada para verificar o teor de formazana no sarcoplasma das fibras musculares⁽¹⁵⁾.

Os resultados observados nas lâminas foram analisados tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Com relação à análise qualitativa, foi realizada observação e descrição dos achados histológicos e histoquímicos. A análise quantitativa das características morfológicas acima descritas foi feita a partir da análise de frequência, na qual foi verificada nas lâminas de cada animal a presença ou ausência destas características. Os valores obtidos na morfometria são apresentados como média e desvio padrão e foram comparados pela análise de variância bifatorial, fixando como fatores o exercício e a exposição à fumaça de cigarro; para comparações múltiplas de médias utilizou-se o teste de Bonferroni. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes.

RESULTADOS

A análise qualitativa das lâminas indicou que os animais do G1 apresentaram fibras musculares com contornos angulares, arredondados, fibras polimórficas e atroficas, sarcolema em degeneração, fibras em processo de fagocitose, infiltrado inflamatório e necrose (figura 1a). Já nos animais do G2, observou-se que a maior parte das fibras apresentava alteração no seu formato, havendo presença de fibras poligonais, arredondadas, angulares e polimórficas; além disso, foram identificadas fibras atroficas com degeneração de sarcolema e infiltrados inflamatórios, sendo estes não muito acentuados (figura 1c).

Em contrapartida, os animais do G3 apresentaram regiões com aspecto normal e outras regiões com fibras angulares, arredondadas e polimórficas, havendo presença de degeneração de sarcolema e algumas fibras atroficas e em processo de fagocitose (figura 1e). Os animais do G4 apresentaram fibras apenas com alterações no formato, apresentando características de normalidade; vale ressaltar que, em todos os grupos estudados, os núcleos encontravam-se na periferia da fibra muscular, não havendo presença de núcleos centrais.

A tabela 1 mostra o resultado da análise quantitativa das alterações histológicas observadas nas fibras musculares dos grupos estudados. Os resultados apontam que os animais do G1 apresentaram a maior frequência de ocorrência de alterações histológicas, inclusive no que diz respeito à presença de fagocitose e inflamação, o mesmo ocorrendo com o G3. Nos animais do G2, as alterações encontradas foram mais relacionadas ao formato das fibras.

Tabela 1. Análise de frequência da ocorrência das características morfológicas das fibras do músculo sóleo nos animais de cada grupo estudado.

Características	G1	G2	G3	G4
F. arredondadas	88%	63%	100%	75%
F. angular	100%	100%	100%	88%
F. polimórfica	100%	100%	100%	38%
F. atrofica	88%	50%	88%	–
Inf. inflamatório	100%	38%	50%	13%
F. fagocitada	100%	13%	88%	–
Necrose	75%	13%	88%	–
Lesão sarcolema	88%	63%	88%	–

Nas lâminas da reação de NADH-TR verificou-se que no G1 havia presença de fibras com atividade reativa fraca, havendo ausência de reação em algumas delas (figura 1b). Com relação ao G2, verificou-se padrão normal de reação para a maioria das fibras, sendo que em poucas delas foi observado aumento da atividade enzimática, caracterizada por agregados amorfos de formazana em posição subsarcolemal e central, indicando a posição das mitocôndrias (figura 1d).

Nos animais do G3 verificou-se que a maior parte das fibras apresentava agregados amorfos de formazana em posição subsarcolemal havendo, entretanto, presença de fibras com perda de atividade enzimática em algumas regiões do corte e distribuição irregular do produto de reação (figura 1f).

De acordo com os resultados obtidos na morfometria (tabela 2), verificou-se que os animais exercitados com (G1) ou sem (G2) exposição à fumaça de cigarro apresentaram as maiores medidas de seções transversas em relação ao grupo controle (G4), enquanto que o grupo somente exposto apresentou os menores valores. Todavia, a análise de variância bifatorial identificou diferença significativa somente para o fator exercício ($p = 0,007$), indicando que apesar dos diferentes valores obtidos a exposição à fumaça ($p = 0,668$) e sua interação com o exercício ($p = 0,077$) não foram os fatores determinantes destas diferenças.

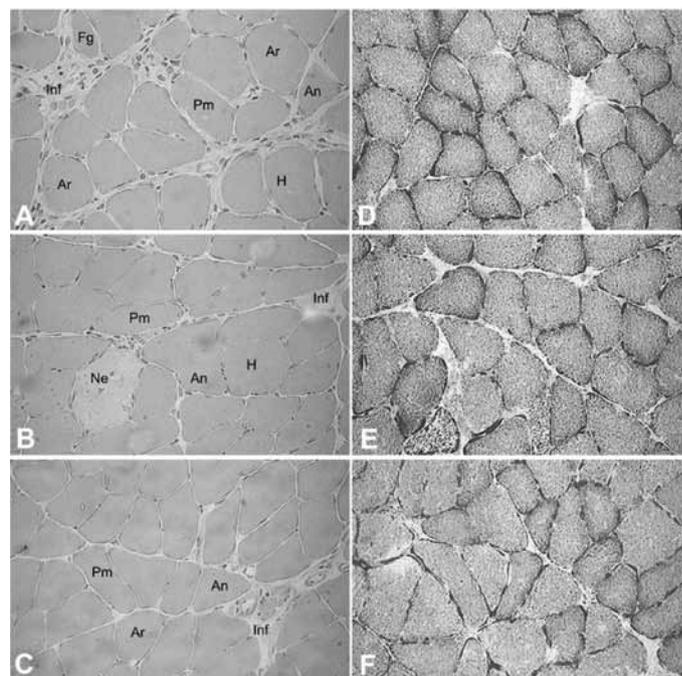


Figura 1. Secção transversal do músculo sóleo de ratos. A) Expostos à fumaça de cigarro e exercitados; B) Exercitados; C) Expostos à fumaça de cigarro. HE, 500x. Fibra arredondada (Ar); fibra angular (An); fibra polimórfica (Pm); fibra hipertrófica (H); infiltrado inflamatório (Inf); necrose (Ne). D) Expostos à fumaça de cigarro e exercitados; E) Exercitados; F) Expostos à fumaça de cigarro. NADH-TR, 500x.

Tabela 2. Valores de morfometria (μm).

	Média \pm DP	IC – 95%	
		Mínimo	Máximo
G1	41,47 \pm 10,06	40,79	42,14
G2	39,54 \pm 8,23	38,98	40,09
G3	35,21 \pm 7,51	34,73	35,68
G4	38,19 \pm 7,06	37,68	38,71

DP = desvio padrão; IC = intervalo de confiança.

DISCUSSÃO

A partir do modelo experimental utilizado e de acordo com os achados histológicos dos diferentes grupos, verificou-se que os animais submetidos à fumaça de cigarro, exercitados ou não, apresentaram maior incidência de alterações musculares (tabela 1). Além disso, verificou-se que o fumo alterou o padrão oxidativo, sendo que sua interação com o exercício resultou em repostas distintas (figura 1).

De fato, estudos anteriores relatam que o fumo exerce influência nas características musculares, podendo produzir uma alteração na porcentagem e no tamanho das fibras, bem como modificações na atividade oxidativa muscular^(2,16,17). Acredita-se que existam dois mecanismos envolvidos no processo de lesão pelo fumo, a ação vasoconstritora promovida pela nicotina e o acréscimo de carboxihemoglobina (COHb) no sangue, estando ambas relacionadas à baixa oxigenação tecidual⁽²⁾.

Em situações de baixo fornecimento de oxigênio ao organismo, o tecido muscular responde na tentativa de se adaptar e, portanto, sofre algumas alterações histológicas importantes, como atrofia e fagocitose de fibras⁽¹⁵⁾. Tais aspectos se fizeram presentes nas fibras musculares deste estudo, sendo que sua relação com a baixa oxigenação pôde ser verificada a partir da análise das lâminas de NADH-TR.

Em relação ao padrão de reação enzimática, foram observadas fibras com perda de atividade e distribuição irregular do produto de reação nos animais submetidos à inalação da fumaça de cigarro. Observou-se, além disso, que os animais somente expostos à fumaça (G3) apresentaram

grande quantidade de agregados amorfos de formazana em posição subsarcolemal, o que indica o deslocamento de mitocôndrias para maior proximidade do núcleo celular.

Entretanto, também foram observadas alterações musculares nos animais somente exercitados (G2), apesar de terem ocorrido de forma mais branda que nos animais do G3. Tais alterações, caracterizadas principalmente por modificações no formato celular e infiltrados inflamatórios, podem ser consideradas respostas normais ao exercício.

Trabalhos anteriores que realizaram a avaliação histológica das fibras do músculo sóleo de animais submetidos a estresse por exercícios de natação⁽¹⁸⁾ e esteira rolante⁽¹³⁾ também identificaram a ocorrência de alterações na forma das fibras musculares e presença de processo inflamatório muscular, identificados como mecanismos adaptativos do tecido muscular ao exercício^(18,19).

No que diz respeito à reação histoquímica de NADH-TR, verificou-se que esses animais tiveram aumento de atividade oxidativa, apresentando padrão de resposta enzimática similar à encontrada nos animais somente expostos à fumaça de cigarro. Apesar desta similaridade, pode-se supor que os mecanismos adaptativos são distintos; no caso dos animais exercitados, as alterações enzimáticas ocorrem devido ao aumento da demanda metabólica⁽²⁰⁾, enquanto que nos animais do G3 a aceleração da cadeia respiratória pode ser entendida como resposta ao fornecimento deficitário de energia decorrente da baixa oxigenação, acarretando na necessidade de um nível ótimo de ativação mitocondrial^(2,16).

Já os animais do G1 foram submetidos a ambas as situações de estresse, havendo assim a necessidade de maiores adaptações. Tal fato, portanto, pode ter levado a uma sobrecarga mitocondrial, resultando em atividade reativa fraca e até perda de atividade oxidativa. Além disso, tais diferenças de estímulos estressores podem também justificar as respostas histológicas e morfométricas distintas encontradas nos diferentes grupos estudados.

Com relação às respostas morfométricas, verificou-se que os animais exercitados apresentaram os maiores valores em relação aos sedentários, sendo somente o exercício o fator que influenciou as alterações no tamanho das fibras. Assim, pode-se dizer que os animais dos grupos exercitados apresentaram hipertrofia de fibras musculares, independente do fator exposição à fumaça de cigarro.

A prática de atividade física está associada a mudanças no tamanho

e na quantidade de fibras musculares, tendo seus praticantes maiores valores de diâmetro de fibras^(13,21). De maneira geral, a hipertrofia muscular é uma adaptação dos músculos à sobrecarga física, que, por sua vez⁽²¹⁾, resulta em ampliação do número de elementos contráteis em paralelo e aumento da tensão máxima que o músculo esquelético pode produzir.

Quanto às respostas adaptativas ao fumo, estudos anteriores^(2,16,17) verificaram uma tendência à atrofia muscular, visando melhor aporte de oxigênio pelos pequenos capilares localizados na membrana. Apesar da presença de fibras atroficas neste estudo, o fator exposição à fumaça não exerceu influência significativa no tamanho das fibras musculares.

Vale ressaltar que apesar do quadro hipertrófico ser positivo para o organismo, os animais exercitados e expostos à fumaça de cigarro foram submetidos a esta interação por apenas 15 dias e, portanto, não se sabe se este efeito persiste após exposições crônicas a esta interação, uma vez que ela demonstrou ser mais agressiva ao músculo esquelético mesmo neste breve período de exposição.

Ademais, estudos trazem que os efeitos da fumaça do cigarro nas fibras musculares de ratos Wistar dependem da dose de exposição, sendo que doses mais altas geram maiores respostas adaptativas^(2,16). Sugere-se, portanto, que outros estudos sejam realizados visando analisar o efeito da interação entre exercício e exposição à fumaça de cigarro na musculatura de ratos por períodos mais prolongados e sob diferentes dosagens. Além disso, neste estudo apenas foi analisado um músculo de característica oxidativa, sendo que músculos com outras características metabólicas podem ser utilizados, a fim de verificar possível seletividade de ação desta interação.

Em síntese, verificou-se nesta pesquisa que a interação entre inalação de fumaça de cigarro e exercício, realizada durante 15 dias em ratos machos Wistar adultos, acentuou as alterações histológicas do músculo sóleo, levando a uma alteração da atividade enzimática e acarretando em aumento do diâmetro das fibras musculares.

Agradecimentos

Ao técnico de laboratório Sidney Siqueira Leirião pelo seu trabalho, e à Profa. Dra. Ana Osório pelo uso do sistema de captura de imagens.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

1. WHO report on the global tobacco epidemic, 2008: the mpower package. World Health Organization, 2008.
2. 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.
3. Morse CI, Pritchard LJ, Wüst RCI, Jones DA, Degens H. Carbon monoxide inhalation reduces skeletal muscle fatigue resistance. *Acta Physiol* 2008;192:397-401.
4. Wüst RCI, Morse CI, Haan A, Rittweger J, Jones DA, Degens H. Skeletal muscle properties and fatigue resistance in relation to smoking history. *Eur J Appl Physiol* 2008;104:103-10.
5. Taylor A, Katomeri M, Ussher M. Acute effect of self-paced walking on urges to smoke during temporary smoking abstinence. *Psychopharmacology* 2005;181:1-7.
6. Daniel JZ, Cropley M, Fife-Schaw C. The effect of exercise in reducing desire to smoke and cigarette withdrawal symptoms is not caused by distraction. *Addiction* 2006;101:1187-92.
7. Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 2002;81:540-51.
8. Kariya F, Yamauchi H, Kobayashi K, Narusawa M, Nakahara Y. Effects of prolonged voluntary wheel-running on muscle structure and function in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2004;92:90-7.
9. Minamoto VB. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. *Fisioterapia e Pesquisa* 2005;12:50-5.
10. Cendon Filha SP. Efeitos do fumo passivo no aparelho mucociliar de ratos. [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 1994.
11. Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Comportamento de variáveis cardíacas em animais expostos à fumaça de cigarro. *Arq Bras Cardiol* 2003;81:221-4.
12. Castardeli E, Paiva SAR, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, et al. A exposição crônica à fumaça do cigarro resulta em remodelação cardíaca e prejuízo da função ventricular em ratos. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:320-4.
13. Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Camargo RCT, Oliveira DAR, Oliveira Júnior AS, Dal Pai V, et al. Análise histológica, histoquímica e morfométrica do músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico em esteira rolante. *Arq Ciênc Saúde* 2005;12:196-5.
14. Sartori JR, Gonzales E, Macari M, Dal Pai V, Oliveira HN. Tipos de fibras no músculo flexor longo do hálux de frangos de corte submetidos ao estresse pelo calor e frio e alimentados em "pair-feeding". *Ver Bras Zootec* 2003;32:918-25.
15. Dubowitz V, Sewry CA. Muscle biopsy: a practical approach. 3rd Ed. China: Saunders Elsevier; 2007.
16. Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Ishihara A. Responses of exposure to cigarette smoke at three dosage levels on soleus muscle fibers in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 2002;9:157-63.
17. Montes De Oca M, Loeb E, Torres SH, De Sanctis J, Hernández N, Tálamo C. Peripheral muscle alterations in non-COPD smokers. *Chest* 2008;131:13-8.
18. Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Camargo RCT, Francischetti FA, Belangero WD, Dal Pai V. Efeitos do esteróide anabólico nandrolona sobre o músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico através de natação: estudo histológico, histoquímico e morfométrico. *Rev Bras Med Esporte* 2006;12:243-8.
19. Brito MKM, Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Tarumoto MH, Dal Pai V, Giacometti JA. Geometrical dimensions of fibers from the soleus muscle in rats exercised on treadmill: the importance of the analysis by means of digitalized images. *Rev Bras Med Esporte* 2006;12:103-7.
20. Foureaux G, Castro Pinto KM, Dâmaso A. Efeito do consumo excessivo de oxigênio após exercício e da taxa metabólica de repouso no gasto energético. *Ver Bras Med Esporte* 2006;12:393-8.
21. Paul AC, Rosenthal N. Different models of hypertrophy in skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 2002;156:751-60.