
Efeito da suplementação de alimentos funcionais no músculo esquelético de ratos expostos cronicamente ao tabagismo

Effect of functional food supplementation on skeletal muscle of rats chronically exposed to smoking

Heliard Rodrigues dos Santos Caetano

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2564-2192>

Faculty of Science and Wellness, Western Sao Paulo University (UNOESTE), Brazil

E-mail: heliard@unoeste.br

Sophia de Castro Bremer

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2100-9189>

Faculty of Nursing, Medicine School of Marília – FAMEMA, Marília, São Paulo, Brazil

E-mail: sophiabremer@gmail.com

Luiz Waldemar de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3753-3006>

Medical School of Presidente Prudente (FAMEPP), Western Sao Paulo University (UNOESTE), Brazil

oliveira@unoeste.br

Adriano Messias de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9462-6503>

Medical School of Presidente Prudente (FAMEPP), Western Sao Paulo University (UNOESTE), Brazil

E-mail: adrianohrpp@gmail.com

Weber Gutemberg Alves de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0548-0595>

Faculty of Science and Wellness, Western Sao Paulo University (UNOESTE), Brazil

E-mail: weber@unoeste.br

Rogéria Keller

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7315-986X>

Faculty of Science and Wellness, Western Sao Paulo University (UNOESTE), Brazil

E-mail: rogeriakeller@unoeste.br

Hermann Bremer-Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9592-8896>

Medical School of Presidente Prudente (FAMEPP), Western Sao Paulo University (UNOESTE), Brazil

E-mail: hermann@unoeste.br

RESUMO

O objetivo foi avaliar o efeito da suplementação oral de probiótico, prebiótico e simbiótico no tecido muscular esquelético, gastrocnêmio, de ratos expostos ao tabagismo, através da dimensão fractal (DF). Sessenta e quatro ratos foram aleatoriamente alocados em 8 grupos (n=8): com ração controle (C) ou suplementadas com probiótico (Pro), prebiótico (Pre) ou simbiótico (Simb) e os quatro grupos foram alimentados com as rações C, Pro, Pre e Simb e expostos ao tabagismo. Após 180 dias de experimento, os animais foram anestesiados, sacrificados e os músculos gastrocnêmios foram submetidos a procedimento histológico de rotina e corados pela técnica de HE. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas e submetidas à análise da DF. Os dados foram submetidos à análise de variância, seguida do teste de Tukey. Os resultados revelaram que a suplementação de probiótico, prebiótico e simbióticos atenuaram os efeitos deletérios da exposição crônica a fumaça do cigarro ($p < 0,05$). Os resultados permitem concluir que a suplementação de probiótico, prebiótico e simbiótico atenuam os efeitos deletérios da exposição crônica e passiva a fumaça do cigarro em ratos machos jovens, como modelo pré-clínico.

Palavras-chave: Probióticos; Prebióticos; Simbióticos; Músculo gastrocnêmio; Dimensão fractal

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of oral probiotic, prebiotic and synbiotic supplementation on the skeletal muscle tissue, gastrocnemius, of rats exposed to smoking, through the fractal dimension (DF). Sixty-four rats were randomly allocated into 8 groups (n=8): with control diet (C) or supplemented with probiotic (Pro), prebiotic (Pre) or synbiotic (Synb) and the four groups were fed with diets C, Pro, Pre and Synb and exposed to smoking. After 180 days of experiment, the animals were anesthetized, sacrificed and the gastrocnemius muscles were subjected to a routine histological procedure and stained using the HE technique. Images of histological sections were captured and subjected to DF analysis. The data were subjected to analysis of variance, followed by the Tukey test. The results revealed that probiotic, prebiotic and synbiotic supplementation mitigated the harmful effects of chronic exposure to cigarette smoke ($p<0.05$). The results allow us to conclude that probiotic, prebiotic and synbiotic supplementation attenuate the harmful effects of chronic and passive exposure to cigarette smoke in young male rats, as a preclinical model.

Keywords: Probiotics; Prebiotics; Symbiotics; Gastrocnemius muscle; Fractal dimension

INTRODUÇÃO

Atualmente cerca de 1,2 milhões de pessoas morrem anualmente devido à exposição passiva a fumaça do cigarro e estima-se que em 2030 ocorrerão mais de oito milhões de mortes, decorrente do aumento do risco de doenças cardiovasculares e doenças e infecções do trato respiratório superior e inferior. Além disso, efeitos colaterais, como a disfunção muscular esquelética, redução da força ou resistência dos músculos esqueléticos periféricos e atrofia muscular, limitam a atividade física dos pacientes e qualidade de vida (HASHEMI-AGHDAM *et al.*, 2022; MORAES *et al.*, 2021; RAMOS; VIEIRA; MARTINS, 2022; SU *et al.*, 2020). As toxinas e resíduos (THS) produzidos pela SHS ou pela fumaça ambiental do tabaco (ETS) se acumulam na poeira e nas superfícies das casas e são reemitidos ao ar e o THS torna-se cada vez mais tóxico com o tempo, o que é um problema para humanos e meio ambiente (MATT *et al.*, 2023).

A exposição de ratos e camundongos a SHS e ao THS demonstrou acarretar disfunção e atrofia dos músculos esqueléticos, pela ação vasoconstritora promovida pela nicotina e o acréscimo de carboxihemoglobina (COHb) no sangue, estando ambas relacionadas à baixa oxigenação tecidual (BOROWIK *et al.*, 2022; HE *et al.*, 2022; LIN; WANG, 2017), assim como danos a múltiplos órgãos e altas concentrações de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo (OSINIBI *et al.*, 2021).

Alimentos funcionais, probióticos, prebióticos e simbióticos, têm demonstrado efeitos antiinflamatórios, imunomoduladores e antioxidantes (HAMED *et al.*, 2018; ROMBI; RUFINO; BREMER-NETO, 2021; TRIBST *et al.*, 2019; YOUNAN *et al.*, 2019) e suplementados por via oral em quantidade e periodicidade adequadas podem acarretar efeitos sistêmicos benéficos. Entretanto, não encontramos estudos pré-clínicos com ratos machos em fase de crescimento, expostos cronicamente a fumaça de cigarro e suplementados com probiótico (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium longum*), prebiótico [mananoligossacarídeo (MOS), oligossacarídeo da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*] e ou simbióticos (combinados o probiótico e o prebiótico) na ração e analisados através da dimensão fractal (DF).

Essa técnica, DF, permite caracterizar estruturas irregulares em lâminas histológicas, a desorganização do músculo esquelético e quantificar alterações

existentes (CURY *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2020; OZAKI *et al.*, 2015). O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da suplementação na ração de alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico, de ratos na fase de crescimento expostos cronicamente a fumaça de cigarro, através da dimensão fractal.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos da Declaração Universal dos Direitos dos Animais da Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) e o protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, sob o número 2724, da Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Brasil.

Sessenta e quatro ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) jovens, 23 dias, foram distribuídos randomicamente por meio de tabela de sequências numéricas aleatórias geradas pelo programa R (HARRELL, 2015), em oito grupos experimentais (n=8): metade dos grupos experimentais foram submetidos a um protocolo de exposição à fumaça de cigarro e os animais foram alimentados com as rações: controle (Supralab Especial, Alisul, RS, Brasil); probiótico [98 g ração controle + 2g de pool de microrganismos probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, $1,0 \times 10^9$ de Unidades Formadoras de Colônias (UFC); *Enterococcus faecium* $2,1 \times 10^9$ UFC; *Bacillus subtilis* $2,9 \times 10^9$ UFC; e *Bifidobacterium bifidum* $2,0 \times 10^9$ UFC por kg de produto)]; Prebiótico [99 g de ração controle + 1g de mananoligossacarídeos - MOS (fração activa, α -1,3 e α -1,6 derivada de um mananoligossacarídeo, apresentando 30% de α -mananos, derivados de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*)]; Simbiótico (97 g de ração controle + 2 g Probióticos + 1 g Prebiótico).

Durante o período experimental de 180 dias, os ratos foram expostos a fumaça de cigarro com as concentrações médias de alcatrão, nicotina e CO de $10,2 \pm 0,1$ mg/cigarro, $0,8 \pm 0,0$ mg/cigarro e $10,1 \pm 0,1$ mg/cigarro (RENNE *et al.*, 2006). O número de cigarros necessários para geração da fumaça foi ajustada para obter uma concentração média de CO (monóxido de carbono) em 350 ppm (partes por milhão), aferido semanalmente através de um detector de gás específico, modelo TxiPro®, da Biosystems (MELLO; THELMA; BOTELHO, 2006) e o condicionamento dos animais a exposição a fumaça do cigarro foi realizado conforme descrito por Tsuji *et al.* (2013).

Aos 203 dias de idade todos os ratos foram anestesiados, eutanasiados por exsanguinação e foi retirado o músculo gastrocnêmio, de onde se retirou um fragmento do ventre muscular, com aproximadamente 2 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro, tomando-se o cuidado de manter as suas fibras longitudinais dispostas no maior eixo do comprimento. Os músculos gastrocnêmios foram fixados em formol a 10% por 48 horas e a seguir passaram pela rotina histológica para emblocamento em parafina. Foram obtidos cortes transversais de 7 µm das fibras musculares, coradas com hematoxilina e eosina, para posterior análise em microscópio óptico (Leica, modelo DM750, Alemanha). As imagens foram capturadas com objetiva de 20x (LAGHI *et al.*, 2022).

Para estimativa da DF do músculo gastrocnêmio foi realizada pelo método box-counting, após as lâminas fotografadas serem binarizadas, por meio do software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH) (OLIVEIRA *et al.*, 2014). O software considera o box-counting em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels no espaço da imagem captada, não considerando a textura da imagem. A influência disso é que duas imagens com a mesma distribuição dos pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuirão a mesma dimensão fractal. Dessa forma, a análise das lâminas histológicas fractais baseia-se na relação entre a resolução e a escala avaliada, e o resultado pode ser quantitativamente expresso como a dimensão fractal do objeto, sendo: $DF = (\log N_r / \log r - 1)$, onde a N_r é a quantidade de elementos iguais necessários para preencher o objeto original e r a escala aplicada ao objeto (Figura 1). Com isso, a dimensão fractal calculada com o software Image J ficará sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes (KARPERIEN *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2021).

Os resultados foram estatisticamente analisados pelo teste de Shapiro-Wilk para normalidade dos dados. Como a distribuição normal foi demonstrada, ANOVA one-way foi utilizado, seguido do teste de Tukey para verificar as diferenças entre os grupos. Para todas as análises, o nível de significância ($p < 0,05$) foi estabelecido em 5%. As análises estatísticas foram realizadas no programa Biostatic 3.1 (AYRES, MANUEL, 2007).

RESULTADOS

A exposição crônica a fumaça de cigarro de ratos jovens aumentou significativamente da fractabilidade ($p < 0,05$) no músculo gastrocnêmio quando comparado com a média dos resultados de ratos que foram alimentados com ração controle e não expostos a fumaça de cigarro. A média dos resultados dos grupos suplementados com alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico e expostos a fumaça de cigarro por 180 dias não diferiram do grupo C ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise da dimensão fractal do músculo gastrocnêmio de ratos Wistar alimentados com ração controle (C) ou suplementadas com probiótico (PRO), prebiótico (PRE) ou simbiótico (SIM) e expostos ou não a fumaça de cigarro durante o período de 180 dias.

Tratamentos ^{1,2}				
Não Tabagista	Tabagista			
C	C	PRO	PRE	SIM
1,273 ± 0,071 ^a	1,353 ± 0,061 ^b	1,326 ± 0,059 ^a	1,293 ± 0,059 ^a	1,330 ± 0,046 ^a

¹Valores de média e desvio padrão. ²Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença estatística, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Em pacientes e modelos animais, as modificações da arquitetura do tecido muscular esquelético associado à deficiência de distrofina, associadas a mecanismos celulares e moleculares subjacentes foram descritas (CURY *et al.*, 2018; ZHOU; LU, 2010) e deve ser resultado da desorganização da matriz extracelular no músculo gastrocnêmio de camundongos machos e pode ser analisada pela técnica da dimensão fractal (CURY *et al.*, 2018).

Nesse estudo, os resultados obtidos demonstraram que a exposição crônica a fumaça do cigarro em ratos alimentados com a ração controle demonstrou aumentar a DF no músculo gastrocnêmio, indicando uma disfunção muscular esquelética (CHAN *et al.*, 2020) e que acarreta a redução da capacidade de exercício, má qualidade de vida e aumento da mortalidade (BARREIRO; GEA, 2016; MALTAIS *et al.*, 2014). Esse efeito maléfico da fumaça de cigarro é resultante dos produtos químicos presentes na fumaça de cigarro, dos quais vários deles, como radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ROS), são conhecidos por serem prejudiciais ao músculo esquelético (ROM *et al.*, 2012). Nesse estudo, os ratos foram repetidamente, 180 dias, expostos a fumaça de cigarro e em camundongos o contato diário com esses produtos químicos causaram

Os grupos alimentados com rações suplementadas com os alimentos funcionais e expostos a fumaça de cigarro, grupos PRO, PRE e SIM, não diferiram do grupo de animais alimentados com ração controle e não exposto a fumaça do cigarro. Apesar dos músculos esqueléticos estarem fisiologicamente distantes do intestino, os sinais gerados pelo intestino devido à sua interação com o microbioma intestinal (metabólitos microbianos, peptídeos intestinais, lipopolissacarídeos e interleucinas) constituem ligações entre a atividade da microbiota intestinal e o músculo esquelético e regulam a funcionalidade muscular através da modulação da inflamação sistêmica/tecido, bem como da sensibilidade à insulina (GIRON *et al.*, 2022).

A suplementação do probiótico na dieta nesse estudo sugere que a modificação da composição da microbiota intestinal, interfere no estado fisiológico e estados catabólicos musculares, eixo intestino-músculo, de forma direta ou indireta, influenciando o estado e a regulação da massa muscular (MANCIN; WU; PAOLI, 2023; PRZEWŁÓCKA *et al.*, 2020; YIN *et al.*, 2022). A microbiota intestinal, no intestino, controla e modula o metabolismo dos ácidos biliares primários e a comunidade microbiana desempenha um papel essencial na modulação do metabolismo sistêmico do hospedeiro (WAHLSTRÖM *et al.*, 2016) e a circulação sistêmica permite que o ácido biliar metabolizado microbianamente atue como moléculas endócrinas, ativando vias mediadas por ácidos biliares e, assim, regulando os processos metabólicos do hospedeiro, incluindo metabolismo de lipídios e glicose, gasto de energia e inflamação sistêmica (SWANN *et al.*, 2011; WATANABE *et al.*, 2006). Além disso, a suplementação do probiótico diminui a expressão de genes relacionados à atrofia (MuRF1 e Atrogin-1), bem como os níveis séricos de citocinas inflamatórias (interleucina 6, monócitos, proteína hemoatraente de monócitos-1 e interleucina 4) (BINDELS *et al.*, 2012).

Em camundongos, com 10 meses de idade, os resultados revelaram um aumento da massa muscular (peso do músculo gastrocnêmio) e a funcionalidade muscular (força muscular) após 12 semanas de suplementação com *Lactobacillus casei* LC122 ou *Bifidobacterium longum* BL986, em comparação com controles da mesma idade, no entanto, o tratamento com esses microrganismos tenha conferido efeitos semelhantes, estas duas espécies bacterianas parecem agir através de diferentes vias celulares (NI *et al.*, 2019).

Os prebióticos também atuam benéficamente na microbiota intestinal, pois são substratos utilizados no trato gastrointestinal e podem induzir o desenvolvimento e/ou ativação metabólica de microrganismos benéficos residentes na microbiota intestinal através da seletividade do substrato, além do seu potencial para melhorar o equilíbrio microbiomecânico, redução da permeabilidade intestinal, muitas vezes coincide com a melhora da massa muscular em camundongos e humanos (VAN KRIMPEN *et al.*, 2021). Estudo em humanos demonstrou que a suplementação com o prebiótico, frutooligosacarídeos, inulina e 1-cestose, acarretou o aumento da população de *Bifidobacterium longum* na microbiota intestinal e acelerou a recuperação da atrofia muscular (TOMINAGA *et al.*, 2021). Nesse estudo os ratos foram alimentados com uma ração suplementada com mananoligosacarídeos (MOS) e esse prebiótico demonstrou que pode modificar a composição da microbiota através de um mecanismo indireto, em vez de atuar como nutriente direto para as populações microbianas intestinais. Especificamente, os MOS são capazes de prevenir a adesão de bactérias patogênicas às células epiteliais intestinais, ligando-se às proteínas de ligação à manose expressas nas fímbrias bacterianas (SPRING *et al.*, 2015).

Através da modulação da microbiota intestinal, o MOS também pode melhorar alguns aspectos morfofuncionais do trato gastrointestinal (BUDIÑO *et al.*, 2005; CASTILLO *et al.*, 2008; REKIEL; WIECEK; BIELECKI, 2007). A administração de MOS em porcos foi associada à proliferação de micróbios benéficos, incluindo bactérias lácticas (LIU *et al.*, 2008; WHITE *et al.*, 2002), que acarretam o aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta, butirato, propionato e acetato, que são os principais metabólitos bacterianos produzidos com a fermentação de fibras dietéticas e amidos resistentes (TAN *et al.*, 2014; YOUNAN *et al.*, 2019) e em humanos os resultados demonstraram poder estimular indiretamente o crescimento e desenvolvimento dos enterócitos, exercendo ação trófica (PESSIONE, 2012).

Em porcos, a suplementação de MOS na dieta resultou na modulação benéfica da imunidade pelo aumento nas concentrações séricas de imunoglobulinas (DUAN *et al.*, 2016), estimulação da imunidade da mucosa (VALPOTIĆ *et al.*, 2016), modulação da resposta inflamatória (DUAN *et al.*, 2019) e homeostase intestinal (ROMBI; RUFINO; BREMER-NETO, 2021). Assim como resultou na diminuição da concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias e aumento dos níveis circulantes de citocina anti-inflamatória interleucina-10 em leitões jovens após a administração de 0,8

mg/kg de peso corporal de MOS (DUAN *et al.*, 2019). O MOS, administrado em leitões, demonstrou também exercer efeitos benéficos na saúde intestinal, melhorando a morfologia duodenal e modulando a expressão de genes relacionados à inflamação, que são acompanhados por uma melhor eficiência alimentar, porém, ainda existe uma falta de conhecimento sobre a modulação da expressão genética relacionada com a inflamação na mucosa do trato gastrointestinal quando suplementados com MOS (AGAZZI *et al.*, 2020).

A suplementação de simbiótico nesse estudo acarretou efeitos benéficos no músculo esquelético gastrocnêmio e esses resultados podem ser decorrentes da redução da expressão e níveis séricos de interleucina (IL)-6, que é uma citocina pró-inflamatória e que é envolvida na progressão da caquexia. O tratamento combinado de *L. reuteri* com oligossacarídeo em camundongos evidenciou aumento significativo da porcentagem de massa corporal (BINDELS *et al.*, 2016). Portanto, resultados benéficos observados com a suplementação de simbiótico na dieta de ratos expostos cronicamente a fumaça de cigarro são decorrentes do efeito sinérgico da combinação dos probióticos e prebióticos (HUGENHOLTZ; DE VOS, 2018; VAN KRIMPEN *et al.*, 2021), contribuindo para a saúde do hospedeiro e a homeostase intestinal/imunológica (BINDELS; DELZENNE, 2013; ROMBI; RUFINO; BREMER-NETO, 2021).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que a exposição crônica ao tabagismo passivo em ratos, como modelo experimental, induz alterações degenerativas. Os alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico, suplementados na ração demonstraram atenuar os efeitos deletérios da exposição passiva crônica do tabagismo crônica no musculo esquelético, gastrocnêmio.

REFERÊNCIAS

AGAZZI, A. et al. Dietary Mannan Oligosaccharides Modulate Gut Inflammatory Response and Improve Duodenal Villi Height in Post-Weaning Piglets Improving Feed Efficiency. *Animals*, v. 10, n. 8, p. 1283, 28 jul. 2020.

AYRES, M. *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém do Pará: Sociedade Civil Mamirauá, 2007.

BARREIRO, E. et al. Cigarette Smoke-induced Oxidative Stress. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 182, n. 4, p. 477–488, 15 ago. 2010.

BARREIRO, E.; GEA, J. Molecular and biological pathways of skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Chronic Respiratory Disease*, v. 13, n. 3, p. 297–311, 23 ago. 2016.

BINDELS, L. B.; DELZENNE, N. M. Muscle wasting: The gut microbiota as a new therapeutic target? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 45, n. 10, p. 2186–2190, out. 2013.

BINDELS, Laure B. et al. Restoring Specific Lactobacilli Levels Decreases Inflammation and Muscle Atrophy Markers in an Acute Leukemia Mouse Model. *PLoS ONE*, v. 7, n. 6, p. e37971, 27 jun. 2012.

_____. Synbiotic approach restores intestinal homeostasis and prolongs survival in leukaemic mice with cachexia. *The ISME Journal*, v. 10, n. 6, p. 1456–1470, 27 jun. 2016.

BOROWIK, A. K. et al. Skeletal Muscle Nuclei in Mice are not Post-mitotic. *FUNCTION*, v. 4, n. 1, p. 1–14, 2022.

BUDIÑO, F. E. L. et al. Effect of probiotic and prebiotic inclusion in weaned piglet diets on structure and ultra-structure of small intestine. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, n. 6, p. 921–929, nov. 2005.

CASTILLO, M. et al. Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function1. *Journal of Animal Science*, v. 86, n. 1, p. 94–101, 1 jan. 2008.

CHAN, S. M. H. et al. Cigarette Smoking Exacerbates Skeletal Muscle Injury without Compromising Its Regenerative Capacity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 62, n. 2, p. 217–230, fev. 2020.

CURY, S. S. et al. Fractal dimension analysis reveals skeletal muscle disorganization in mdx mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 503, n. 1, p. 109–115, 3 set. 2018.

DUAN, X. et al. Mannan oligosaccharide supplementation in diets of sow and (or) their offspring improved immunity and regulated intestinal bacteria in piglet1. *Journal of*

Animal Science, v. 97, n. 11, p. 4548–4556, 4 nov. 2019. DUAN, X. D. et al. Effects of dietary mannan oligosaccharide supplementation on performance and immune response of sows and their offspring. Animal Feed Science and Technology, v. 218, p. 17–25, 1 ago. 2016.

FABBRI, L. M.; RABE, K. F. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? The Lancet, v. 370, n. 9589, p. 797–799, 1 set. 2007.

GIRON, M. et al. Gut microbes and muscle function: can probiotics make our muscles stronger? Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, v. 13, n. 3, p. 1460–1476, 12 jun. 2022.

HAMED, H. et al. Fermented camel milk by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* attenuates erythrocytes oxidative stress-induced hematological and immunological damage in CCl₄-intoxicated mice. Environmental Science and Pollution Research, v. 25, n. 26, p. 25983–25993, 2 set. 2018.

HARRELL, F. E. R Software. R A Lang. Environ. Stat. Comput. Vienna: [s.n.], 2015. p. 127–142.

HASHEMI-AGHDAM, M. R. et al. Trend of passive smoking and associated factors in Iranian children and adolescents: the CASPIAN studies. BMC Public Health, v. 22, n. 1, p. 603, 29 dez. 2022.

HE, A. W. J. et al. Impacts of Cigarette Smoke (CS) on Muscle Derangement in Rodents — A Systematic Review. Toxics, v. 10, p. 262, 2022.

HUGENHOLTZ, F.; DE VOS, W. M. Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 75, n. 1, p. 149–160, 9 jan. 2018.

KARPERIEN, A. et al. Automated detection of proliferative retinopathy in clinical practice. Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.), v. 2, n. 1, p. 109–122, mar. 2008.

LAGHI, V. et al. A User-Friendly Approach for Routine Histopathological and Morphometric Analysis of Skeletal Muscle Using CellProfiler Software. Diagnostics, v. 12, n. 3, p. 561, 22 fev. 2022.

LIN, C.; WANG, J. Reduced nuclear translocation of serum response factor is associated with skeletal muscle atrophy in a cigarette smoke-induced mouse model of COPD. International Journal of COPD, v. 12, p. 581–587, 2017.

LIU, P. et al. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs. Journal of Animal Science, v. 86, n. 10, p. 2609–2618, 1 out. 2008.

MALTAIS, F. et al. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Update on Limb Muscle Dysfunction in Chronic Obstructive

Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 189, n. 9, p. e15–e62, 1 maio 2014.

MANCIN, L.; WU, G. D.; PAOLI, A. Gut microbiota–bile acid–skeletal muscle axis. *Trends in Microbiology*, v. 31, n. 3, p. 254–269, 1 mar. 2023.

MATT, G. E. et al. Policy-relevant differences between secondhand and thirdhand smoke: strengthening protections from involuntary exposure to tobacco smoke pollutants. *Tobacco Control*, v. 0, p. tc-2023-057971, 1 jun. 2023.

MELLO, P. R. B. O.; THELMA, S.; BOTELHO, C. Influência da exposição a fumaça lateral do cigarro sobre o ganho de peso e o consumo alimentar de ratas gestantes: análise do peso e do comprimento dos filhotes ao nascimento. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 28, n. 3, p. 143–150, mar. 2006.

MESHI, B. et al. Emphysematous Lung Destruction by Cigarette Smoke. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 26, n. 1, p. 52–57, 1 jan. 2002.

MORAES, C. A. De et al. Morphofunctional study on the effects of passive smoking in kidneys of rats Estudo morfofuncional sobre os efeitos do. *Einstein*, n. 19, p. 1–8, 2021.

NI, Y. et al. Lactobacillus and Bifidobacterium Improves Physiological Function and Cognitive Ability in Aged Mice by the Regulation of Gut Microbiota. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 63, n. 22, p. 1900603, 25 nov. 2019.

OLIVEIRA et al. Evaluation by fractal dimension of muscle regeneration after photobiomodulation. *Fisioterapia em Movimento*, v. 33, p. e003339, 24 jul. 2020.

OLIVEIRA, M. A. B. de et al. Comparison of fractal dimension and Shannon entropy in myocytes from rats treated with histidine-tryptophan-glutamate and histidine-tryptophan cetoglutamate. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v. 29, n. 2, p. 156–162, 2014.

OSINIBI, M. et al. Passive tobacco smoke in children and young people during the COVID-19 pandemic. *The Lancet Respiratory Medicine*, v. 9, n. 7, p. 693–694, 1 jul. 2021.

OZAKI, G. et al. Fractal Analysis of Skeletal Muscle Tissue of Rats Subjected to Stretch Injury Análisis Fractal de Tejido Muscular Esquelético en Ratas Sometidas a Lesión por Estiramiento. *Int. J. Morphol*, v. 33, n. 3, p. 908–913, 2015.

PESSIONE, E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 2, p. 86, 2012.

PRZEWŁÓCKA, K. et al. Gut-Muscle Axis Exists and May Affect Skeletal Muscle Adaptation to Training. *Nutrients*, v. 12, n. 5, p. 1451, 18 maio 2020.

RAMOS, G. V.; VIEIRA, R. P.; MARTINS, M. A. Moderate Treadmill Training Induces Limited Effects on Quadriceps Muscle Hypertrophy in Mice Exposed to

Cigarette Smoke Involving. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, v. 17, p. 33–42, 2022.

REKIEL, A.; WIECEK, J.; BIELECKI, W. Effect of addition of feed antibiotic flavomycin or prebiotic BIO-MOS on production results of fatteners, blood biochemical parameters, morphometric indices of. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, v. 50, p. 172–180, 2007.

RENNE, R. A. et al. Effects of Flavoring and Casing Ingredients on the Toxicity of Mainstream Cigarette Smoke in Rats. *Inhalation Toxicology*, v. 18, n. 9, p. 685–706, 6 jan. 2006.

ROM, O. et al. Identification of possible cigarette smoke constituents responsible for muscle catabolism. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, v. 33, n. 3–4, p. 199–208, 22 ago. 2012.

ROMBI, A. V.; RUFINO, M. N.; BREMER-NETO, H. Probiotics , prebiotics and symbiotics attenuate chronic effects of passive smoking on physiological and biochemical parameters in rats : A randomized and controlled study Probióticos , prebióticos e simbióticos atenuam os efeitos crônicos do tabagismo pa. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 8, p. 1–18, 2021.

SILVA, L. G. da et al. Fractal dimension analysis as an easy computational approach to improve breast cancer histopathological diagnosis. *Applied Microscopy*, v. 51, n. 6, p. 1–9, 2021.

SPRING, P. et al. A review of 733 published trials on Bio-Mos®, a mannan oligosaccharide, and Actigen®, a second generation mannanose rich fraction, on farm and companion animals. *Journal of Applied Animal Nutrition*, v. 3, n. e7, p. e8, 20 maio 2015.

SU, J. et al. The rat model of COPD skeletal muscle dysfunction induced by progressive cigarette smoke exposure: a pilot study. *BMC Pulmonary Medicine*, v. 20, n. 1, p. 74, 23 dez. 2020.

SWANN, J. R. et al. Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. supplement_1, p. 4523–4530, 15 mar. 2011.

TAN, J. et al. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Adv. Immunol.* [S.l: s.n.], 2014. v. 121. p. 91–119.

TOMINAGA, K. et al. Increase in muscle mass associated with the prebiotic effects of 1-kestose in super-elderly patients with sarcopenia. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, v. 40, n. 3, p. 2020– 063, 2021.

TRIBST, M. F. et al. Mineral composition, histomorphometry, and bone biomechanical properties are improved with probiotic, prebiotic, and symbiotic supplementation in rats chronically exposed to passive smoking: a randomized pre-clinical study. *Ciência Rural*, v. 49, n. 5, 2019.

TSUJI, H. et al. Comparison of Biological Responses in Rats Under Various Cigarette Smoke Exposure Conditions. *Journal of Toxicologic Pathology*, v. 26, n. 2, p. 159–174, jun. 2013.

VALPOTIĆ, H. et al. Effect of mannan oligosaccharide supplementation on blood and intestinal immune cells, bacteria numbers and performance in weaned pigs. *Acta Veterinaria Brno*, v. 85, n. 3, p. 267–276, 2016.

VAN KRIMPEN, S. J. et al. The Effects of Pro-, Pre-, and Synbiotics on Muscle Wasting, a Systematic Review—Gut Permeability as Potential Treatment Target. *Nutrients*, v. 13, n. 4, p. 1115, 29 mar. 2021.

VLAHOS, R. et al. Differential protease, innate immunity, and NF- κ B induction profiles during lung inflammation induced by subchronic cigarette smoke exposure in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 290, n. 5, p. L931–L945, maio 2006.

WAHLSTRÖM, A. et al. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metabolism*, v. 24, n. 1, p. 41–50, 12 jul. 2016.
WATANABE, M. et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, v. 439, n. 7075, p. 484–489, 8 jan. 2006.

WHITE, L. A. et al. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *Journal of Animal Science*, v. 80, n. 10, p. 2619, 2002.

YIN, Y. et al. Role of brain-gut-muscle axis in human health and energy homeostasis. *Frontiers in Nutrition*, v. 9, p. 947033, 6 out. 2022.

YOUNAN, S. et al. Probiotic mitigates the toxic effects of potassium dichromate in a preclinical study: a randomized controlled trial. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 99, n. 1, p. 183–190, 15 jan. 2019.

ZHOU, L.; LU, H. Targeting Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 69, n. 8, p. 771–776, 1 ago. 2010.