

**RICARDO APARECIDO BAPTISTA NUCCI**

**Análise histomorfométrica do músculo diafragma em diferentes idades: um estudo de correlação clinicopatológica da carga tabágica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Wilson Jacob Filho

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de Outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP.

**São Paulo**

**2022**

**RICARDO APARECIDO BAPTISTA NUCCI**

**Análise histomorfométrica do músculo diafragma em diferentes idades: um estudo de correlação clinicopatológica da carga tabágica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Wilson Jacob Filho

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de Outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP.

**São Paulo**

**2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nucci, Ricardo Aparecido Baptista  
Análise histomorfométrica do músculo diafragma  
em diferentes idades : um estudo de correlação  
clinicopatológica da carga tabágica / Ricardo  
Aparecido Baptista Nucci. -- São Paulo, 2022.  
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Patologia.  
Orientador: Wilson Jacob Filho.

Descritores: 1.Diafragma 2.Envelhecimento  
3.Histologia 4.Músculo 5.Patologia 6.Tabagismo

USP/FM/DBD-088/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **DEDICATÓRIA**

A minha amada mãe Tânia Rita Baptista que sempre acreditou no meu potencial e permaneceu ao meu lado em todos os momentos de minha vida. Assim como a toda a minha querida família que me apoiou e me auxiliou ao longo dos anos, principalmente as minhas tias Sueli Batista e Ana Maria Batista Zugaib.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por toda a luz, sabedoria, saúde e força que me foi dada nestes anos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wilson Jacob Filho, pela sua orientação, paciência e dedicação neste projeto. Sua orientação foi de suma importância para o meu desenvolvimento pessoal, profissional e intelectual.

Ao meu colega Prof. Dr. Alexandre Leopold Busse, pelo seu companheirismo e dedicação no decorrer deste projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Kimie Suemoto pela possibilidade de trabalhar junto a equipe do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital durante este projeto.

Aos meus colegas da Universidade São Judas Tadeu, principalmente o Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Laura Beatriz Mesiano Maifrino pela oportunidade de utilizar o Laboratório de Estudos Morfoquantitativos e Imunohistoquímica (LEMI) para a confecção deste trabalho.

Aos meus colegas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Rio Claro, principalmente o Prof. Dr. Carlos Alberto Anaruma por seu auxílio nas técnicas histológicas.

A toda a equipe do Laboratório de Investigação Médica em Envelhecimento (LIM-66) e do Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento por permitirem a construção deste projeto na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar este doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos que foi de suma importância para a realização deste trabalho.

*“Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança”*

Stephen Hawking

## RESUMO

Nucci RAB. *Análise histomorfométrica do músculo diafragma em diferentes idades: um estudo de correlação clinicopatológica da carga tabágica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

O tabagismo é um importante fator de risco para várias doenças cardiovasculares e pulmonares, e também têm sido associado à perda de massa e força muscular esquelética levando à sarcopenia. Assim, o presente estudo analisou os efeitos histopatológicos do processo de envelhecimento do diafragma, em indivíduos de ambos os sexos, em diferentes faixas etárias, a fim de avaliar se a carga tabágica é responsável por acréscimo das correlações clinicopatológicas. Amostras do músculo diafragma post-mortem foram coletadas e processadas para análise histológica através das colorações histológicas de Picrosirius red e hematoxilina e eosina. Utilizou-se a estereologia e a morfometria para mensurar as alterações nas fibras musculares, bem como a densidade de volume das fibras colágenas, adipócitos e vasos sanguíneos (incluindo capilares). A análise estatística, com nível de significância  $P < 0,05$ , foi realizada através do programa SPSS. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média para variáveis contínuas e frequência absoluta e relativa para as categóricas. Utilizamos o Teste T de Student (bicaudal e não pareado) para comparar as variáveis contínuas entre os indivíduos fumantes com os não-fumantes (controle). As variáveis categóricas foram analisadas através do Teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher quando necessário. Para testar se as distribuições de tamanhos de fibras normais eram diferentes entre os grupos, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. A fim de entender como as variáveis demográficas e clínicas podem atuar nos achados histopatológicos, realizamos uma análise de regressão multivariada. Observamos que com o avanço da idade, o diafragma acumula características histopatológicas que podem levar a complicações na mecânica respiratória. Ademais, o tabagismo demonstrou atuar negativamente na histologia diafragmática, sendo que a carga tabágica

desempenha papel de suma importância no acréscimo de características histopatológicas neste músculo.

**Descritores:** Diafragma; Envelhecimento; Histologia; Músculo; Patologia; Tabagismo.



## ABSTRACT

Nucci RAB. *Histomorphometric analysis of the diaphragm muscle at different ages: a clinicopathological correlation study of smoking load* [thesis]; São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Smoking is a major risk factor for several cardiovascular and pulmonary diseases, and has also been associated with loss of skeletal muscle mass and strength leading to sarcopenia. Thus, the present study analyzed the histopathological effects of the aging process of the diaphragm, in individuals of both sexes, in different age groups, in order to assess whether the smoking load is responsible for the increase in clinicopathological correlations. Post-mortem diaphragm muscle samples were collected and processed for histological analysis through Picrosirius red and hematoxylin and eosin staining techniques. Stereology and morphometry were used to measure changes in muscle fibers, as well as the volume density of collagen fibers, adipocytes and blood vessels (including capillaries). Statistical analysis, with a significance level of  $P < 0.05$ , was performed using the SPSS software. Data were presented as mean  $\pm$  standard error of mean for continuous variables and absolute and relative frequency for categorical variables. We used Student's T test (two-tailed and unpaired) to compare continuous variables between smokers and non-smokers (control). Categorical variables were analyzed using the chi-square test or Fisher's exact test when necessary. To test whether normal fiber size distributions were different between groups, the Kolmogorov-Smirnov test was used. In order to understand how demographic and clinical variables may affect histopathological findings, we performed a multivariate regression analysis. We observed that with advancing age, the diaphragm accumulates histopathological characteristics that can lead to complications in respiratory mechanics. Furthermore, smoking has shown to have a negative effect on diaphragmatic histology, and smoking history plays a key role in the increase of histopathological characteristics in this muscle.

**Descriptors:** Diaphragm; Aging; Histology; Muscle; Pathology; Tobacco use disorder.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características histopatológicas para análise estereológica em cortes transversais corados por hematoxilina e eosina do músculo diafragma.....	10
<b>Tabela 2.</b> Características dos indivíduos incluídos nos grupos.....	14
<b>Tabela 3.</b> Análise histopatológica entre tabagistas e não-tabagistas (controle).....	15
<b>Tabela 4.</b> Análise de regressão multivariada da área de secção transversa das fibras normais.....	19
<b>Tabela 5.</b> Análise de regressão multivariada do citoplasma atípico.....	20
<b>Tabela 6.</b> Análise de regressão multivariada do núcleo central.....	21
<b>Tabela 7.</b> Análise de regressão multivariada de fibras musculares com tamanho e formato atípico.....	22
<b>Tabela 8.</b> Análise de regressão multivariada da densidade de adipócitos.....	23
<b>Tabela 9.</b> Análise de regressão multivariada do depósito de fibras colágenas.....	24
<b>Tabela 10.</b> Análise de regressão multivariada de vasos sanguíneos.....	25

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fotomicrografias, coradas por hematoxilina e eosina, do diafragma de indivíduos tabagistas.....	10
<b>Figura 2.</b> Fluxograma dos participantes do estudo.....	13
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografias do músculo diafragma entre os grupos controle e tabagista coradas por hematoxilina e eosina.....	16
<b>Figura 4.</b> Fotomicrografias do músculo diafragma coradas por picosirius red.....	16
<b>Figura 5.</b> Área de secção transversa.....	17

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AVC:** Acidente Vascular Cerebral

**$\beta$ :** Coeficiente Beta

**CAPESQ – FMUSP:** Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**CT:** Carga Tabágica

**DPOC:** Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

**EP:** Erro Padrão

**HIV:** Vírus da imunodeficiência humana

**IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IC 95%:** Intervalo de Confiança de 95%

**IMC:** Índice de Massa Corporal

**LEMI:** Laboratório de Estudos Morfoquantitativos e Imunohistoquímica

**MMP:** Metaloproteinases

**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de Determinação

**SEADE:** Sistema Estadual de Análise de Dados

**SVOC:** Serviço de Verificação de Óbitos da Capital de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Envelhecimento Populacional.....	1
1.2. Envelhecimento do Sistema Respiratório e sua Musculatura.....	1
1.3. Efeitos do Tabagismo no Sistema Respiratório e sua Musculatura .....	3
<b>2. Hipótese</b> .....	5
2.1. Justificativa do Trabalho.....	5
<b>3. Objetivo Principal</b> .....	6
3.1. Objetivos Específicos.....	6
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	7
4.1. Tipo de Estudo.....	7
4.2. Casuística.....	7
4.3. Critérios de Inclusão.....	8
4.4. Critérios de Exclusão.....	8
4.5. Metodologia para Análise Histopatológica.....	8
4.6. Parâmetros Morfoquantitativos Analisados.....	9
4.7. Análise Estatística.....	11
<b>5. Resultados</b> .....	13
5.1. Casuística.....	13
5.2. Análise Histopatológica.....	14
5.3. Análises Multivariadas.....	18
<b>6. Discussão</b> .....	26
<b>7. Conclusão</b> .....	31

<b>8. Referências</b> .....	32
<b>Anexos</b> .....	43
<b>Anexo I.</b> Aprovação do Comitê de Ética.....	43
<b>Anexo II.</b> Permissão para utilizar o LEMI da Universidade São Judas Tadeu.....	45
<b>Anexo III.</b> Lista de publicações decorrentes da Tese.....	46
<b>Anexo IV.</b> Recibo digital Turnitin.....	47

## **1. Introdução**

### **1.1. Envelhecimento Populacional**

O crescimento da população de indivíduos idosos, em números absolutos e relativos, é considerado um fenômeno mundial (IBGE, 2021; Mendes, 2010; DATASUS, 2019). Este crescimento vem ocorrendo em razão da diminuição da taxa de natalidade e do crescente aumento da expectativa de vida, ocasionando uma consequente distensão da parte superior da pirâmide etária observada pelo crescimento da população com 65 anos ou mais (Kalache, 2007; DATASUS, 2019).

No Brasil, de acordo com a projeção realizada pelo IBGE, a proporção da faixa etária acima de 60 anos será de aproximadamente 66 milhões em 2050, representando um aumento de aproximadamente 135% em comparação aos 28 milhões de idosos em 2019 (IBGE, 2021). Sendo que, a projeção decorrente do Sistema Estadual de Análise de Dados (SEADE), estima aproximadamente 14 milhões de idosos situados em São Paulo até 2050 (SEADE, 2021).

### **1.2. Envelhecimento do Sistema Respiratório e sua Musculatura**

O processo de envelhecimento pode ser definido como a soma de alterações biológicas, psicológicas e sociais que levam à redução gradual da capacidade de adaptação e de desempenho do indivíduo (Carvalho e Garcia, 2003; Weinert e Timiras, 2003). Dentre os diversos sistemas biológicos do corpo, o sistema respiratório é um dos mais afetados pelo envelhecimento (Janssens, 2005; Greising et al., 2013; Greising et al., 2015a; Greising et al., 2015b; Elliott et al., 2016a). Estudos têm demonstrado que as complicações respiratórias estão entre as maiores causadoras de mortalidade em idosos (Houston et al. 1997; Chong e Street, 2008; Heron et al., 2010; Greising et al., 2015a; Elliott et al., 2016a).

Durante o processo natural de envelhecimento do sistema respiratório, são consideradas como principais mudanças: diminuição nas dimensões da caixa torácica, bem como da elasticidade dos pulmões; e redução das propriedades contráteis do diafragma, resultando na perda progressiva de sua força muscular

(Rodrigues et al., 1996; Polkey et al., 1997; Janssens, 2005; Greising et al., 2013). Estas alterações, embora próprias do envelhecimento não patológico, acarretam modificações fisiológicas importantes no sistema respiratório (Janssens, 2005; Jacob Filho et al., 2014).

Além disso, estudos mostraram redução da espessura dos músculos da parede torácica, decorrente da perda de massa muscular associada ao processo fisiológico de envelhecimento, o que resulta em diminuição da amplitude da caixa torácica na respiração (Hochegger et al., 2012). Em adição, histologicamente, com o avanço da idade nos pulmões, ocorre perda de elastina, e deposição contínua de fibras colágenas, devido a menor atividade de metaloproteinases 1 e 2 (MMP-1 e MMP-2), com conseqüente aumento da dificuldade para realizar a respiração, resultando assim na perda progressiva da função pulmonar (Meyer et al., 1998; Calabresi et al., 2007).

Particularmente, o músculo diafragma por sua função é um dos principais componentes do mecanismo da ventilação. Através de movimentos rítmicos, este músculo auxilia no aumento e na diminuição da amplitude da caixa torácica permitindo a expansão e retração dos pulmões. A inspiração, seja tranquila, seja forçada, depende da contração do diafragma e dos músculos intercostais, promovendo assim entrada de ar nos pulmões. Já na expiração, o diafragma permanece relaxado permitindo que a retração elástica dos pulmões, da parede torácica, e das estruturas abdominais exerçam compressão sobre os pulmões, ocasionando dessa forma a saída do ar (Pengelly et al., 1971; Poole et al., 1997; Bonora e Vizek, 1999).

O músculo diafragmático, assim como os demais componentes associados à mecânica da respiração, sofre alterações decorrentes do avanço da idade (Tolep et al., 1995; Polkey et al., 1997; Greising et al., 2015b). Com o envelhecimento, estudos observaram uma tendência de diminuição da massa muscular do diafragma, devido a alterações histopatológicas, diminuindo deste modo a capacidade de geração de força pelo músculo, caracterizando um quadro de



sarcopenia (Doherty, 2003; Janssens, 2005; Cruz-Jentoft et al., 2010; Greising et al., 2015a Greising et al., 2015b).

Estes dados permitem ressaltar que as pessoas mais velhas têm risco aumentado de desenvolver doenças no trato respiratório, pois o envelhecimento do pulmão torna-o susceptível tanto ao ambiente, no qual o indivíduo está inserido, como a aspectos relacionados à poluição, e hábitos diários, que podem influenciar de maneira negativa os órgãos responsáveis pela respiração (Kampa e Castanas, 2008; Fragoso e Gill, 2011).

Particularmente, em relação à poluição, ela pode ser entendida como qualquer destruição, degradação ou alteração das condições ambientais, do *habitat* e da coletividade humana (Manzetti et al., 2014; WHO, 2017). Aqui é importante ressaltar que podem ser considerados agentes poluentes todos os gases tóxicos liberados, desde derivados de petróleo até mesmo a fumaça do cigarro (WHO, 2017).

### **1.3. Efeitos do Tabagismo no Sistema Respiratório e sua Musculatura**

A literatura tem destacado o tabagismo como um dos fatores de risco para doenças cardíacas e acidente vascular cerebral (AVC) (US Department of Health and Human Services et al., 2004). Trabalhos demonstraram que este hábito, está associado ao infarto agudo do miocárdio em homens e mulheres, bem como a doença cardíaca coronariana (Fagerström, 2002; US Department of Health and Human Services et al., 2004; Meyers et al., 2009).

No entanto, a fumaça do cigarro, pode acarretar alterações importantes no sistema respiratório e órgãos associados (Hunninghake e Crystal, 1983; Bonham et al., 2001). Esta afirmação têm como base estudos que demonstraram que quando inalada pelo fumante ou por aqueles ao seu redor, a fumaça do cigarro resulta em um aumento da incidência de processos inflamatórios e oxidativos nos pulmões de fumantes em comparação com não fumantes, sugerindo que o tabagismo ocasiona modificações histopatológicas que afetam a fisiologia respiratória (Hunninghake e

Crystal, 1983; Asami et al., 1997; Bonham et al., 2001), sendo ainda capaz de promover processos oncológicos através de danos oxidativos ao DNA (Asami et al., 1997; Hackshaw et al., 1997; Hecht, 1999; Bonham et al., 2001; Jemal et al., 2008).

Em relação a musculatura respiratória, estudos identificaram o tabagismo como fator de risco para sarcopenia, pois interfere tanto no processo de síntese de proteínas musculares quanto na expressão de genes associados à manutenção do tecido muscular (Oca et al., 2008; Petersen et al., 2007; Rom et al., 2012; Steffl et al., 2015).

Na musculatura esquelética, o estudo de coorte MINUS proveniente de Szulc et al. (2004), que incluiu em sua amostragem 845 homens com idades entre 45 e 85 anos, demonstrou que os fumantes apresentavam menor massa muscular apendicular relativa do que os indivíduos que nunca tinham fumado. Além disso, o estudo de coorte em Rancho Bernardo, analisou a prevalência de sarcopenia e fatores de risco em 1.700 homens e mulheres com idade entre 55 e 98 anos, identificou o tabagismo como um fator de risco reversível para sarcopenia (Castillo et al., 2003). Em adição, um trabalho semelhante demonstrou associação entre sarcopenia e tabagismo em 4.000 idosos chineses (Lee et al., 2007). Contudo, a literatura é escassa quanto aos efeitos do tabagismo na musculatura do sistema respiratório, principalmente no diafragma com o envelhecimento.

## **2. Hipótese**

Apresentando papel fundamental no mecanismo da ventilação, o diafragma sofre alterações decorrentes do processo de envelhecimento e aparentemente da exposição crônica ao tabaco. Em ambas situações temos como consequência um provável quadro de sarcopenia diafragmática. Desta maneira, temos como hipótese de que alterações histológicas na musculatura, proveniente da ação do envelhecimento associado ou não ao tabaco, pode limitar a capacidade do diafragma de realizar suas funções, tendo como resultado, um quadro de sarcopenia que culmina na facilitação de complicações respiratórias. Daí a importância de estudos demonstrando os efeitos associados a este processo utilizando instrumentos que permitam evidenciar as alterações histopatológicas do músculo no envelhecimento associado ou não ao tabagismo.

### **2.1. Justificativa do Trabalho**

Devido ao envelhecimento populacional, entender como hábitos de vida como o tabagismo influenciam na musculatura esquelética, principalmente do diafragma, torna-se de suma importância. Ademais, a literatura é escassa quanto aos efeitos do tabagismo na histologia do músculo diafragma de idosos.

### **3. Objetivo Principal**

Investigar os efeitos histológicos do processo de envelhecimento do diafragma, em indivíduos de ambos os sexos, em diferentes faixas etárias, a fim de avaliar se o tabagismo e a carga tabágica são responsáveis pelo acréscimo das correlações clinicopatológicas.

#### **3.1. Objetivos Específicos**

Além dos aspectos clínicos, serão comparadas, entre os grupos, as seguintes características histopatológicas do músculo diafragma, por meio de análise estereológica e análise morfométrica:

- 1) Fibras musculares com formato atípico (indicativo de lesão muscular);
- 2) Fibras com núcleos centrais (indicativo de atrofia);
- 3) Área de secção transversa das fibras musculares típicas;
- 4) Fibras colágenas (tecido fibroso);
- 5) Depósito de tecido adiposo (adipócitos)
- 6) Vasos sanguíneos (vascularização)

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1. Tipo de Estudo**

Trata-se de estudo morfoquantitativo com correlação clinicopatológica, realizado de maneira transversal, valendo-se de informações clínicas obtidas por meio de prontuário clínico e da análise histopatológica através do estudo de tecido muscular estriado diafragmático *post-mortem*.

### **4.2. Casuística**

Foram utilizadas amostras de músculo diafragma de indivíduos de ambos os sexos com ou sem histórico de tabagismo. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPESQ – FMUSP) através do número de registro: 2.209.383 (Anexo I).

Todas as amostras foram coletadas em cadáveres, desde que devidamente autorizado pelos seus familiares, sendo que anteriormente à data do óbito estes indivíduos eram acompanhados no Instituto Central do Hospital das Clínicas de São Paulo. Os indivíduos autorizados pelos familiares foram submetidos a exame necroscópico a partir de agosto de 2018 pelo Serviço de Verificação de Óbitos da Capital de São Paulo (SVOC) localizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram incluídos na amostra todos os indivíduos disponíveis, dos quais foram retiradas as seguintes informações através de prontuário clínico: sexo, idade, altura, peso, patologias clinicamente comprovadas, causa do óbito, atividade física, e carga tabágica (CT) representada pelo número de cigarros fumados por dia dividido por 20 (número padrão de cigarros em um maço) e o resultado foi multiplicado pelo número de anos de uso de tabaco (maços-ano) (Fagerström, 2002).

### **4.3. Critérios de Inclusão**

Os seguintes critérios foram utilizados para que as amostras sejam incluídas no trabalho:

- Indivíduos com diferentes idades;
- Características clínicas relevantes a pesquisa provenientes do prontuário

### **4.4. Critérios de Exclusão**

Foram excluídos materiais de:

- Pacientes portadores de comorbidades que pudessem, potencialmente, prejudicar a homeostase, no período anterior ao óbito e, portanto, influenciar nos resultados do trabalho (exemplo: metástase, HIV e ventilação mecânica);
- Indivíduos com histórico de doenças, comprovadas por exame clínico, no trato respiratório (exemplo: doença pulmonar obstrutiva crônica [DPOC] identificada por espirometria);
- Indivíduos com doenças neuromusculares;
- Pacientes com histórico de alcoolismo.

### **4.5. Metodologia para Análise Histopatológica**

Foram obtidos fragmentos de aproximadamente 2 centímetros do músculo diafragma de sua região próxima à parede torácica anterior junto a sua inserção direita, afastado do centro tendíneo (Poole et al., 1997; Scott et al., 2006; Nucci et al., 2018). O material foi coletado em cassetes histológicos numerados (HistoCell, São Paulo, Brasil), imediatamente fixado em formaldeído a 10% e armazenado por no máximo 24 horas (Eriksson et al., 1980; Van Ee et al., 2000; Ward e Lieber, 2005; Nucci et al., 2018). Após este período, as amostras foram incluídas em blocos de parafina para procedimentos histopatológicos (Suriyonplengsaeng et al., 2017). Este material foi acompanhado das características clínicas em ficha preenchida pelo responsável da necropsia.

Realizamos cortes transversais com 6 micrômetros de espessura nos blocos de parafina (Scott et al., 2006; Nucci et al., 2018). Os cortes não seriados foram corados pelo método padrão de hematoxilina e eosina (Dubowitz et al., 2013) para análise histopatológica (Nucci et al., 2018). Outros cortes, não seriados, foram corados por Picrosirius Red para analisar, por meio de parâmetros estereológicos, as fibras colágenas, que aparecem em vermelho (Junqueira et al., 1979).

#### **4.6. Parâmetros Morfoquantitativos Analisados**

No presente estudo, utilizamos duas ferramentas para análise dos dados: a estereologia e a morfometria.

A estereologia tem como objetivo determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes bidimensionais por meio da densidade de volume, ou seja, o quanto uma determinada estrutura ocupa de espaço numa imagem utilizando, geralmente, um sistema teste com pontos (Mandarim-de-Lacerda, 2003). No entanto, a morfometria, diferentemente da estereologia, não fornece dados tridimensionais ou espaciais da estrutura em estudo. Na morfometria utilizamos medidas aferidas por softwares específicos que nos permitem, por exemplo, reconhecer a área de uma determinada estrutura ( $\mu\text{m}^2$ ), ou a distância entre duas estruturas ( $\mu\text{m}$ ).

Neste estudo, analisamos por meio da estereologia a densidade de volume das fibras colágenas, vasos sanguíneos (incluindo capilares) e adipócitos, bem como dos parâmetros histopatológicos descritos na Tabela 1. Ainda, podemos observar na Figura 1, alguns exemplos de fibras com alterações.

**Tabela 1.** Características histopatológicas para análise estereológica em cortes transversais corados por hematoxilina e eosina do músculo diafragma (adaptado de Scott et al., 2006)

Características	Definição
<b>Normais</b>	
Núcleo periférico	Núcleo situado dentro de 2 $\mu\text{m}$ de sarcolema.
Citoplasma normal	Citoplasma uniformemente texturizado.
Tamanho e forma normal	Tamanho homogêneo e forma poligonal.
<b>Com alteração</b>	
Núcleo central	Mínimo 2 $\mu\text{m}$ de citoplasma entre o núcleo e o sarcolema.
Citoplasma atípico	Fibra de coloração pálida com textura granular; vacuolada ou rompida indicando perda de integridade do citoplasma; acumulação de lipofuscina.
Tamanho e forma atípica	Fibra pequena (menos que 1/3 de diâmetro das três maiores fibras no campo); fibra angulada com aspecto côncavo; fibra arredondada de aspecto lobular.



**Figura 1.** Fotomicrografias, coradas por hematoxilina e eosina, do diafragma de indivíduos tabagistas. (A) a seta preta indica o citoplasma rompido. (B) seta preta indica fibra de coloração pálida com quantidade de núcleos aumentada promovendo um aspecto granular; já a seta branca mostra a fibra arredondada com aspecto lobular. (C) a seta amarela mostra uma pequena fibra angulada. Barra de 50  $\mu\text{m}$ .

Utilizamos um sistema teste com 336 pontos para as análises estereológicas. Os devidos cálculos para obtenção dos resultados e comparações estatísticas (Mandarim-de-Lacerda, 2003) foram realizados por análise de imagens digitalizadas através do software Image J (*National Institutes of Health*, versão 1.45s) acoplado



ao computador do Laboratório de Estudos Morfoquantitativos e Imunohistoquímica (LEMI) da Universidade São Judas Tadeu (Anexo II).

Por fim, utilizamos a morfometria para mensurar a distância entre o núcleo e o sarcolema ( $\mu\text{m}$ ), bem como a área ( $\mu\text{m}^2$ ) de secção transversa (espessura) de aproximadamente quatro fibras musculares de características normais em cada fotomicrografia corada por hematoxilina e eosina, a fim de evidenciar de que forma o envelhecimento associado ou não ao tabagismo afeta o músculo diafragma. Ademais, devido a presença de mais de um núcleo por fibra, foi realizada a média da distância entre os núcleos e o sarcolema para classificação de cada fibra muscular. A mensuração dos parâmetros descritos foi realizada com auxílio do software AxioVision (Zeiss, versão 4.9.1), acoplado ao microscópio Zeiss (Modelo binocular - Axio Lab.A1) do LEMI da Universidade São Judas Tadeu.

A análise quantitativa do músculo diafragma foi realizada através de 20 fotomicrografias retiradas de campos aleatórios para cada técnica histopatológica em cada paciente (40 fotomicrografias por paciente). Todas as lâminas foram analisadas através do método *blind*, ou seja, as características dos sujeitos não eram conhecidas durante a análise das lâminas, para assim evitar possíveis vies (MacCoun e Perlmutter, 2015). As características de cada paciente eram apenas identificadas na etapa de tabulação dos dados para análise estatística.

#### **4.7. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada através do programa SPSS versão 21. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média para variáveis contínuas e frequência absoluta e relativa para as categóricas. O nível de significância utilizado foi  $P < 0,05$  para todos os testes estatísticos. Utilizamos o Teste T de Student (bicaudal e não pareado) para comparar as variáveis contínuas entre os indivíduos fumantes com os não-fumantes (controle). As variáveis categóricas foram analisadas através do Teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher

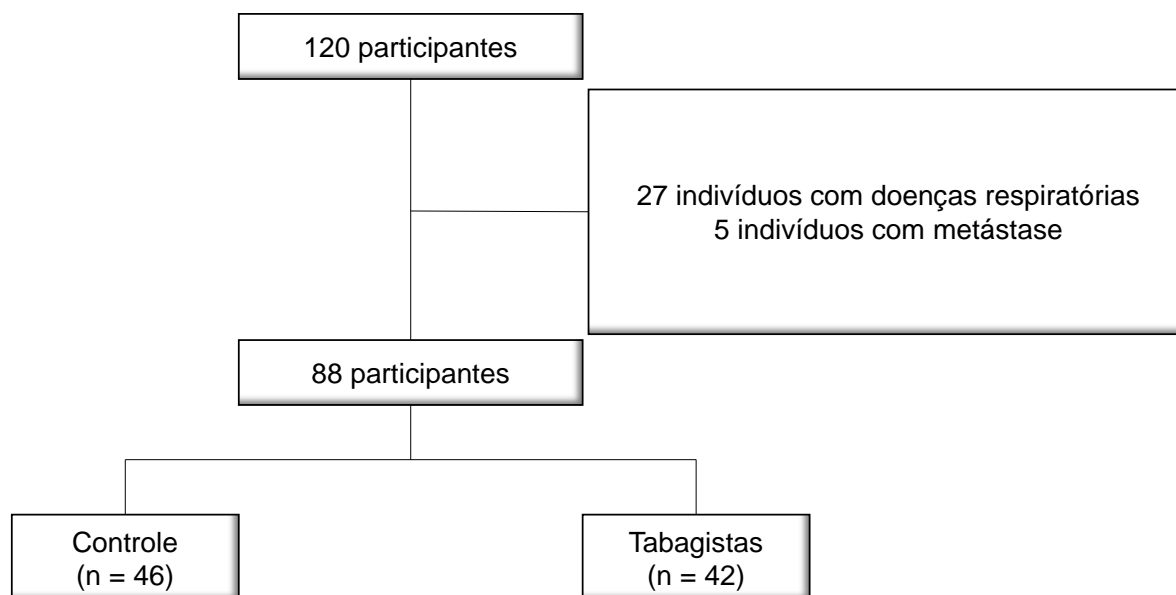
quando necessário. Para testar se as distribuições de tamanhos de fibras normais eram diferentes entre os grupos, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov.

A fim de entender como as variáveis demográficas e clínicas podem atuar nos achados histopatológicos, realizamos uma análise de regressão multivariada através do coeficiente beta ( $\beta$ ), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  ajustado) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). As variáveis categóricas foram tabuladas de maneira binominal no SPSS através de zero e um. Os valores contínuos foram mantidos desta maneira para a análise.

## 5. Resultados

### 5.1. Casuística

De agosto de 2018 a julho de 2019, foram coletados fragmentos de músculo diafragma de 120 indivíduos. Destes casos, foram excluídos 32 indivíduos resultando assim no fluxograma da Figura 2.



**Figura 2.** Fluxograma dos participantes do estudo.

As características dos indivíduos incluídos no estudo estão presentes na Tabela 2. Podemos observar que dentre as características, a idade foi significativamente diferente dentre os grupos ( $p < 0,05$ ), sendo que os tabagistas eram mais jovens que o grupo não-tabagista quando faleceram. Ademais, observamos um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de óbitos por pneumonia no grupo controle quando comparado ao grupo tabagista. Ainda, os indivíduos que não eram sedentários, de ambos os grupos, praticavam caminhada por  $47,5 \pm 8,6$  minutos por semana no grupo controle *versus*  $33,9 \pm 5,4$  minutos por semana no grupo tabagista, sendo esta diferença não significativa entre os grupos.

**Tabela 2.** Características dos indivíduos incluídos nos grupos

	Controle (n = 46)	Tabagista (n = 42)	P
<b>Características</b>			
Idade (anos), média (EP) <sup>1</sup>	79,35 (2,00)	68,83 (1,85)	0,0002
Masculino, n (%) <sup>2</sup>	24 (52,17)	23 (54,76)	0,8079
Peso (kg), média (EP) <sup>1</sup>	60,45 (2,82)	63,76 (3,09)	0,4309
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), média (EP) <sup>1</sup>	20,94 (0,81)	22,02 (0,82)	0,3547
Sedentarismo, n (%) <sup>2</sup>	30 (65,21)	28 (66,66)	0,8861
Período de tabagismo (anos), média (EP)	-	41,45 (2,54)	-
Maços-ano, média (EP)	-	55,57 (5,30)	-
<b>Causa do óbito</b>			
Acidente vascular encefálico, n (%) <sup>2</sup>	5 (10,86)	7 (16,66)	0,4286
Infarto agudo do miocárdio, n (%) <sup>2</sup>	21 (45,65)	24 (57,14)	0,2814
Choque hipovolêmico, n (%) <sup>2</sup>	3 (6,52)	4 (9,52)	0,6032
Choque séptico, n (%) <sup>2</sup>	5 (10,86)	4 (9,52)	0,8351
Pneumonia, n (%) <sup>2</sup>	12 (26,08)	3 (7,14)	0,0182
<b>Patologias clinicamente comprovadas</b>			
Demência, n (%) <sup>2</sup>	8 (17,39)	4 (9,52)	0,2827
Diabetes mellitus, n (%) <sup>2</sup>	18 (39,13)	16 (38,09)	0,9206
Doença renal crônica, n (%) <sup>2</sup>	3 (6,52)	2 (4,76)	0,7217
Hipertensão, n (%) <sup>2</sup>	25 (54,34)	22 (52,38)	0,8534

IMC = Índice de Massa Corporal; EP = Erro Padrão. <sup>1</sup>Teste T de Student bicaudal e não pareado. <sup>2</sup>Teste Qui-quadrado

## 5.2. Análise Histopatológica

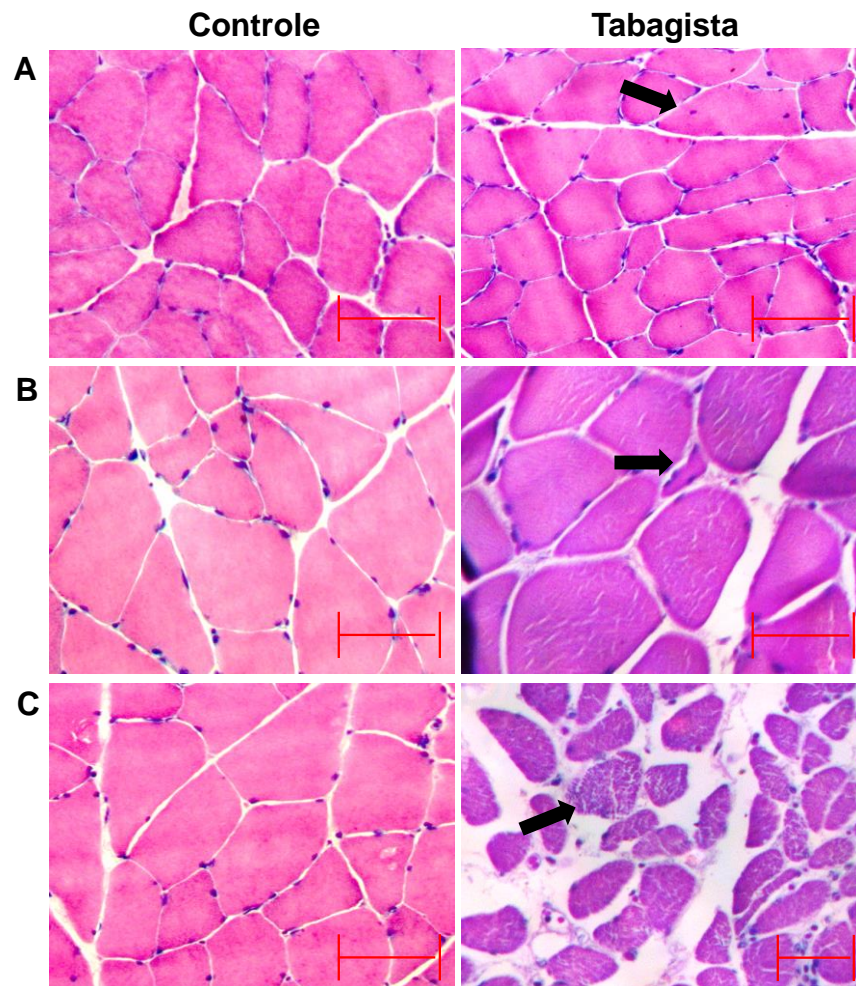
A análise do músculo diafragma indicou modificações significativas no grupo tabagista quando comparados ao controle (Tabela 3). Observamos um aumento significativo de 127,70%, 228,08%, 27,72%, 41,66%, 54,76%, 377,5% em adipócitos, citoplasma atípico, fibras colágenas, núcleo central, tamanho e formato atípico de fibras musculares e vasos sanguíneos, respectivamente.

**Tabela 3.** Análise histopatológica entre tabagistas e não-tabagistas (controle).

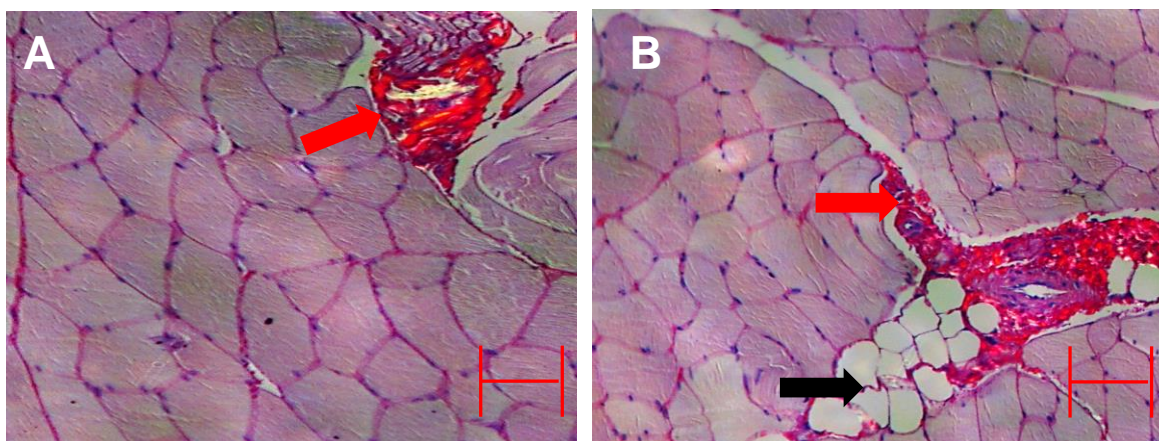
	Controle (n =46)	Tabagista (n = 42)	P
Adipócitos, média (EP)	3,25 (0,24)	7,40 (0,47)	0.0001
Citoplasma atípico, média (EP)	2,67 (0,09)	8,76 (0,44)	0.0001
Fibras colágenas, média (EP)	13,78 (0,07)	17,60 (0,15)	0.0001
Núcleo central, média (EP)	7,20 (0,50)	10,20 (0,30)	0.0001
Tamanho e formato atípico, média (EP)	2,10 (0,06)	3,25 (0,07)	0.0001
Vasos sanguíneos, média (EP)	0,40 (0,10)	1,91 (0,32)	0.0001

EP = Erro Padrão

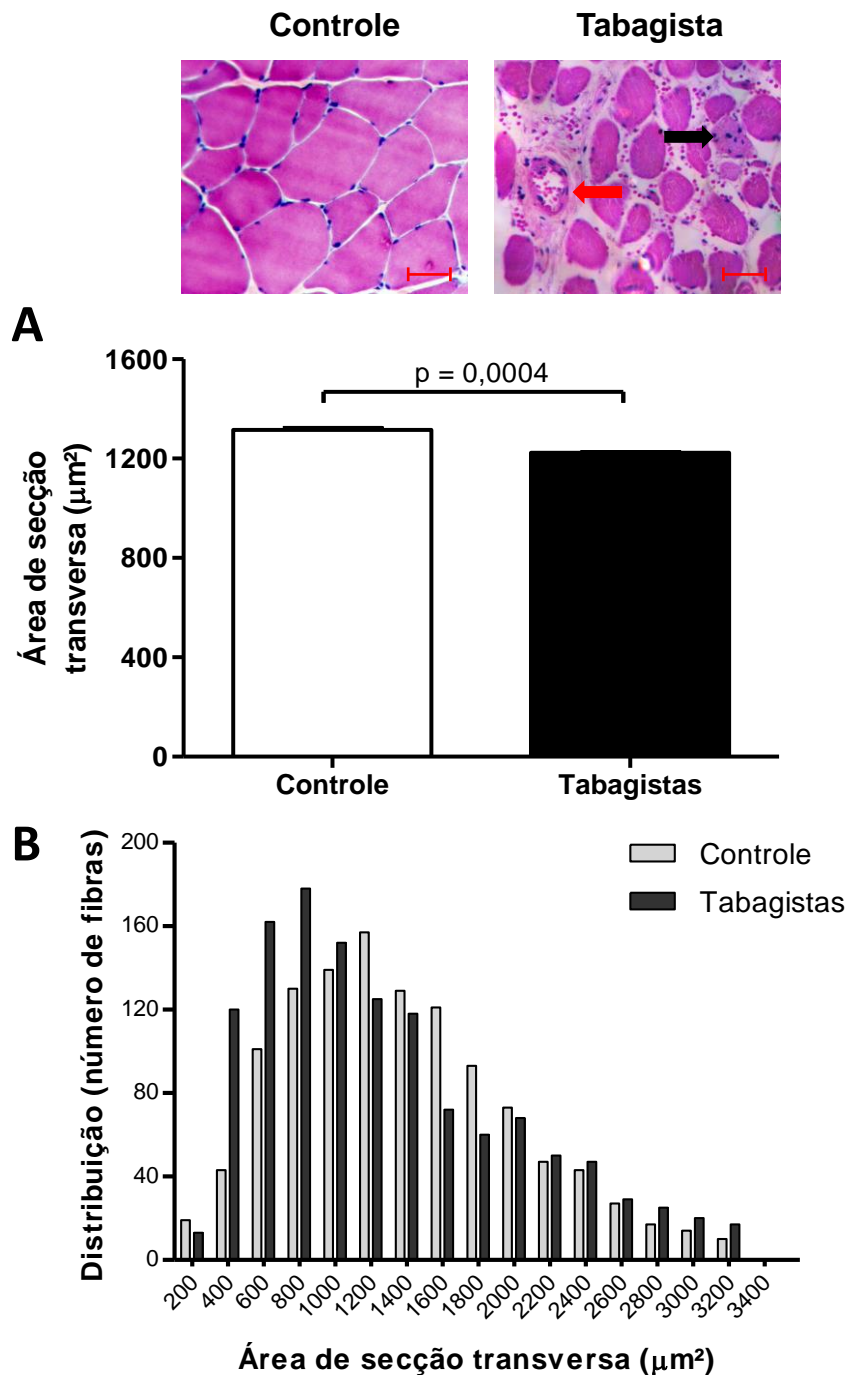
Dentre os achados histopatológicos analisados, destacamos a centralização do núcleo celular, uma ampla variedade de fibras pequenas, bem como a perda da integridade citoplasmática e aumento de infiltrados inflamatórios, sugerindo atrofia muscular (Figura 3). Ademais, o aumento de fibras colágenas junto ao tecido adiposo sugerem comprometimento da função diafragmática (Figura 4). Em adição, observamos que os pacientes fumantes apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) na área de fibras com características típicas do diafragma quando comparados ao grupo controle ( $1224,10 \pm 2,27$  versus  $1316,05 \pm 7,51 \mu\text{m}^2$ , respectivamente). Além disso, o teste de Kolmogorov-Smirnov mostrou que suas distribuições cumulativas eram diferentes ( $p < 0,001$ ), com uma proporção maior de fibras menores nas amostras dos fumantes (Figura 5).



**Figura 3.** Fotomicrografias do músculo diafragma entre os grupos controle e tabagista coradas por hematoxilina e eosina. (A) Podemos observar uma fibra com núcleo central (seta preta). (B) A seta preta indica uma fibra com tamanho e formato atípico. (C) Nota-se uma fibra muscular com citoplasma rompido (seta). Barra = 50 µm.



**Figura 4.** Fotomicrografias do músculo diafragma entre os grupos controle (A) e tabagista (B) coradas por picrosirius red demonstrando depósitos de colágeno (seta vermelha) e adipócitos (seta preta). Barra = 50 µm.



**Figura 5.** Área de secção transversa. (A) Gráfico quanto a área de secção transversa total das fibras consideradas normais entre os grupos. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão. (B) Gráfico da distribuição de fibras normais de acordo com a área analisado pelo método de Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0,001$ ). Fotomicrografias representativas coradas por hematoxilina e eosina são observadas para ambos os grupos controle e tabagista. Podemos observar uma fibra atípica com infiltrado inflamatório (seta preta) e um vaso sanguíneo (seta vermelha). Barra = 50 µm.

### 5.3. Análises Multivariadas

Em cada parâmetro histopatológico, foi realizada uma análise de regressão multivariada (coeficiente  $\beta$  e IC 95%) com as variáveis demográficas e clínicas disponíveis (Modelo I – todas as variáveis disponíveis), onde aquelas que apresentassem resultado significativo seriam analisadas novamente (Modelo II – apenas variáveis do modelo I com significância estatística). Ademais, o  $R^2$  ajustado foi colocado em cada modelo. Assim, as tabelas abaixo se referem as análises das fibras musculares (área de secção transversa e fibras com características atípicas) e dos componentes musculares (adipócitos, depósito de colágeno e vasos sanguíneos).

Na Tabela 4 podemos observar os resultados da regressão multivariada na área de secção transversa das fibras com características normais. No modelo I observamos que a idade, tabagismo e anos-maço reduzem a área das fibras musculares. Ao analisar apenas estas três variáveis (modelo II) observamos que os mesmos permanecem significantes na redução da área das fibras.



**Tabela 4.** Análise de regressão multivariada da área de secção transversa das fibras normais (n=88).

	Modelo I: $\beta$ (IC 95%)	Modelo II: $\beta$ (IC 95%)
<b>Características</b>		
Idade	-0,0660 (-0,0812; -0,0508)*	-0,0618 (-0,0742; -0,0495)*
Sexo	0,1363 (-0,2740; 0,5471)	-
IMC	-0,0196 (-0,1088; 0,0695)	-
Sedentarismo	-0,0214 (-0,3815; 0,3387)	-
Tabagismo	-2,0561 (-2,7605; -1,3517)*	-2,3804 (-2,7208; -2,0401)*
Período de tabagismo (anos)	-0,0055 (-0,0246; 0,0135)	-
Anos-maço	-1.3764 (-1.4726; -1.2802)*	-1,3789 (-1,4732; -1,2600)*
<b>Causa do óbito</b>		
Acidente vascular encefálico	-0,2755 (-0,7387; 0,1875)	-
Infarto agudo do miocárdio	-0,0678 (-0,4083; 0,2726)	-
Choque hipovolêmico	-0,1040 (-0,4637; 0,2556)	-
Choque séptico	0,1866 (-0,3818; 0,7550)	-
Pneumonia	-0,0282 (-0,5143; 0,4578)	-
<b>Patologias clinicamente comprovadas</b>		
Demência	0,1376 (-0,3773; 0,6526)	-
Diabetes mellitus	0,0930 (-0,2677; 0,4538)	-
Doença renal crônica	-0,1205 (-0,8821; 0,6410)	-
Hipertensão	0,0334 (-0,3186; 0,3855)	-

Modelo I: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,7201) entre área de secção transversa e todas as variáveis. Modelo II: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,7237) entre área de secção transversa e as variáveis significativas do Modelo I (idade, tabagismo e anos-maço).  $\beta$ : Coeficiente Beta. IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%. \* $p \leq 0,05$ .

A análise multivariada referente ao citoplasma atípico está apresentada na Tabela 5. Podemos observar no modelo I que a idade, diabetes, tabagismo, período de tabagismo e anos-maço aumentam a densidade de fibras com citoplasma atípico. Entretanto, o IMC e a causa da morte por cardiopatias está relacionada a um declínio nestas fibras. No modelo II, observamos que apenas as variáveis que estão relacionadas ao aumento deste parâmetro se mantiveram significantes.

**Tabela 5.** Análise de regressão multivariada do citoplasma atípico (n=88).

	Modelo I: $\beta$ (IC 95%)	Modelo II: $\beta$ (IC 95%)
<b>Características</b>		
Idade	0,1057 (0,0956; 0,1157)*	0,1060 (0,0959; 0,1161)*
Sexo	-0,0295 (-0,2801; 0,2209)	-
IMC	-0,1036 (-0,1415;-0,0657)*	-0,0231 (-0,0480; 0,0017)
Sedentarismo	-0,0114 (-0,2940; 0,2712)	-
Tabagismo	11,2676 (10,3256; 12,2097)*	9,0381 (8,5074; 9,5688)*
Período de tabagismo (anos)	0,0202 (0,0073; 0,0321)*	0,0208 (0,0099; 0,0316)*
Anos-maço	0,0853 (0,0789; 0,0918)*	0,0860 (0,0792; 0,0923)*
<b>Causa do óbito</b>		
Acidente vascular encefálico	0,0680 (-0,2456; 0,3818)	-
Infarto agudo do miocárdio	-0,2365 (-0,4686;-0,0044)*	-0,1739 (-0,4264; 0,0785)
Choque hipovolêmico	-0,5040 (-1,0204; 0,0124)	-
Choque séptico	0,1723 (-0,2736; 0,6184)	-
Pneumonia	-0,0826 (-0,4640; 0,2987)	-
<b>Patologias clinicamente comprovadas</b>		
Demência	0,2803 (-0,1237; 0,6844)	-
Diabetes mellitus	0,4740 (0,2240; 0,7241)*	0,3189 (0,0486; 0,5893)*
Doença renal crônica	-0,0437 (-0,6413; 0,5539)	-
Hipertensão	0,0548 (-0,1850; 0,2947)	-

Modelo I: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,9886) entre o citoplasma atípico e todas as variáveis.

Modelo II: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,9848) entre o citoplasma atípico e as variáveis significativas do Modelo I (idade, IMC, morte por causa cardiovascular, diabetes mellitus, tabagismo, período de tabagismo e anos-maço).  $\beta$ : Coeficiente Beta. IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%. \* $p \leq 0,05$ .

Na Tabela 6, observamos que a idade, diabetes, tabagismo, período de tabagismo e anos-maço estão relacionados com o aumento da densidade de volume de fibras com núcleo central. Entretanto, o IMC e a causa da morte por cardiopatias diminuem este parâmetro. Contudo, no modelo II observamos que apenas as variáveis que estão relacionadas ao aumento deste parâmetro se mantiveram significantes.

**Tabela 6.** Análise de regressão multivariada do núcleo central (n=88).

	Modelo I: $\beta$ (IC 95%)	Modelo II: $\beta$ (IC 95%)
<b>Características</b>		
Idade	0,0711 (0,0631; 0,0792)*	0,0718 (0,0640; 0,0796)*
Sexo	-0,0491 (-0,2508; 0,1525)	-
IMC	-0,0709 (-0,1014; -0,0404)*	-0,0186 (-0,0378; 0,0005)
Sedentarismo	0,0724 (-0,1407; 0,2856)	-
Tabagismo	3,3442 (2,5859; 4,1025)*	1,8229 (1,4135; 2,2324)*
Período de tabagismo (anos)	0,0128 (0,0025; 0,0232)*	0,0168 (0,0084; 0,0252)*
Anos-maço	0,0529 (0,0483; 0,0575)*	0,0535 (0,0485; 0,0580)*
<b>Causa do óbito</b>		
Acidente vascular encefálico	-0,0312 (-0,2837; 0,2212)	-
Infarto agudo do miocárdio	-0,1944 (-0,3812; -0,0076)*	-0,1231 (-0,3179; 0,0716)
Choque hipovolêmico	-0,0752 (-0,2881; 0,1377)	-
Choque séptico	0,1591 (-0,1773; 0,4956)	-
Pneumonia	-0,1187 (-0,4064; 0,1690)	-
<b>Patologias clinicamente comprovadas</b>		
Demência	0,1507 (-0,0740; 0,3755)	-
Diabetes mellitus	0,3335 (0,1324; 0,5350)*	0,2298 (0,0212; 0,4384)*
Doença renal crônica	-0,0196 (-0,4705; 0,4312)	-
Hipertensão	0,0799 (-0,1131; 0,2730)	-

Modelo I: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,9171) entre o núcleo central e todas as variáveis.

Modelo II: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,9024) entre o núcleo central e as variáveis significativas do Modelo I (idade, IMC, morte por causa cardiovascular, diabetes mellitus, tabagismo, período de tabagismo e anos-maço).  $\beta$ : Coeficiente Beta. IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%. \* $p \leq 0,05$ .

Na Tabela 7, observamos que apenas a idade, tabagismo, período de tabagismo e anos-maço estão relacionados ao aumento da densidade de volume de fibras musculares com tamanho e formato anormais em ambos os modelos I e II.

**Tabela 7.** Análise de regressão multivariada de fibras musculares com tamanho e formato atípico (n=88).

	Modelo I: $\beta$ (IC 95%)	Modelo II: $\beta$ (IC 95%)
<b>Características</b>		
Idade	0,0468 (0,0427; 0,0509)*	0,0466 (0,0433; 0,0500)*
Sexo	0,0285 (-0,0735; 0,1307)	-
IMC	-0,0000 (-0,0154; 0,0153)	-
Sedentarismo	0,0120 (-0,0874; 0,1114)	-
Tabagismo	0,8461 (0,4619; 1,2302)*	0,8342 (0,6488; 1,0195)*
Período de tabagismo (anos)	0,0095 (0,0042; 0,0148)*	0,0121 (0,0084; 0,0159)*
Anos-maço	0,0553 (0,0511; 0,0594)*	0,0560 (0,0518; 0,0590)*
<b>Causa do óbito</b>		
Acidente vascular encefálico	-0,0725 (-0,2004; 0,0553)	-
Infarto agudo do miocárdio	0,0207 (-0,0739; 0,1153)	-
Choque hipovolêmico	-0,0839 (-0,2657; 0,0978)	-
Choque séptico	0,0445 (-0,1124; 0,2015)	-
Pneumonia	0,0081 (-0,1261; 0,1423)	-
<b>Patologias clinicamente comprovadas</b>		
Demência	0,1411 (-0,0011; 0,2833)	-
Diabetes mellitus	0,0459 (-0,0559; 0,1479)	-
Doença renal crônica	-0,0232 (-0,2336; 0,1870)	-
Hipertensão	-0,0065 (-0,1043; 0,0912)	-

Modelo I: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,9342) entre fibras musculares com tamanho e formato atípico e todas as variáveis. Modelo II: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,9304) entre fibras musculares com tamanho e formato atípico e as variáveis significativas do Modelo I (idade, tabagismo, período de tabagismo e anos-maço).  $\beta$ : Coeficiente Beta. IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%. \* $p \leq 0,05$ .

Em relação a densidade de adipócitos (Tabela 8), observamos que a idade, diabetes, tabagismo e anos-maço estão relacionados ao aumento deste parâmetro. Contudo, no modelo II apenas o diabetes não demonstrou significância neste parâmetro.

**Tabela 8.** Análise de regressão multivariada da densidade de adipócitos (n=88).

	Modelo I: $\beta$ (IC 95%)	Modelo II: $\beta$ (IC 95%)
<b>Características</b>		
Idade	0,0684 (0,0555; 0,0815)*	0,0692 (0,0586; 0,0799)*
Sexo	0,0288 (-0,3229; 0,3806)	-
IMC	-0,0215 (-0,0979; 0,0548)	-
Sedentarismo	0,1647 (-0,1339; 0,4635)	-
Tabagismo	1,8981 (1,2948; 2,5014)*	2,4610 (2,1699; 2,7522)*
Período de tabagismo (anos)	0,0104 (-0,0006; 0,0267)	-
Anos-maço	0,0523 (0,0472; 0,0575)*	0,0525 (0,0482; 0,0570)*
<b>Causa do óbito</b>		
Acidente vascular encefálico	0,0970 (-0,2996; 0,4937)	-
Infarto agudo do miocárdio	-0,1479 (-0,4395; 0,1436)	-
Choque hipovolêmico	-0,4433 (-0,9892; 0,1026)	-
Choque séptico	0,2096 (-0,2618; 0,6811)	-
Pneumonia	-0,1393 (-0,5426; 0,2638)	-
<b>Patologias clinicamente comprovadas</b>		
Demência	0,2798 (-0,0351; 0,5947)	-
Diabetes mellitus	0,4136 (0,1045; 0,7226)*	0,2602 (-0,0171; 0,5376)
Doença renal crônica	-0,1447 (-0,7764; 0,4870)	-
Hipertensão	-0,1196 (-0,4211; 0,1819)	-

Modelo I: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,8157) entre a densidade de adipócitos e todas as variáveis. Modelo II: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,8084) entre a densidade de adipócitos e as variáveis significativas do Modelo I (idade, diabetes mellitus, tabagismo e anos-maço).  $\beta$ : Coeficiente Beta. IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%. \* $p \leq 0,05$ .

Na Tabela 9, observamos que a idade, diabetes, tabagismo, período de tabagismo e anos-maço estão relacionados ao aumento do depósito de fibras colágenas no músculo diafragma. Entretanto, o IMC apresentou efeito oposto neste parâmetro. Contudo, no modelo II, observamos que apenas a idade, tabagismo, período de tabagismo e anos-maço continuam significantes em relação a este parâmetro.

**Tabela 9.** Análise de regressão multivariada do depósito de fibras colágenas (n=88).

	Modelo I: $\beta$ (IC 95%)	Modelo II: $\beta$ (IC 95%)
<b>Características</b>		
Idade	0,0857 (0,0805; 0,0910)*	0,0867 (0,0818; 0,0916)*
Sexo	-0,0724 (-0,2030; 0,0581)	-
IMC	-0,0368 (-0,0566; -0,0171)*	-0,0104 (-0,0225; 0,0015)
Sedentarismo	0,0424 (-0,0933; 0,1781)	-
Tabagismo	5,8262 (5,3351; 6,3172)*	5,0459 (4,7890; 5,3028)*
Período de tabagismo (anos)	0,0103 (0,0036; 0,0171)*	0,0127 (0,0075; 0,0180)*
Anos-maço	0,0459 (0,0430; 0,0488)*	0,0462 (0,0428; 0,0486)*
<b>Causa do óbito</b>		
Acidente vascular encefálico	-0,0559 (-0,2194; 0,1075)	-
Infarto agudo do miocárdio	-0,1049 (-0,2259; 0,0159)	-
Choque hipovolêmico	-0,2109 (-0,4590; 0,0370)	-
Choque séptico	0,0765 (-0,1377; 0,2907)	-
Pneumonia	-0,0068 (-0,1900; 0,1763)	-
<b>Patologias clinicamente comprovadas</b>		
Demência	0,1855 (-0,0084; 0,3796)	-
Diabetes mellitus	0,1782 (0,0479; 0,3085)*	0,1061 (-0,0205; 0,2328)
Doença renal crônica	-0,0249 (-0,3119; 0,2621)	-
Hipertensão	0,0234 (-0,1016; 0,1484)	-

Modelo I: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,9902) entre o depósito de fibras colágenas e todas as variáveis. Modelo II: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,9889) entre o depósito de fibras colágenas e as variáveis significativas do Modelo I (idade, IMC, diabetes mellitus, tabagismo, período de tabagismo e anos-maço).  $\beta$ : Coeficiente Beta. IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%. \* $p \leq 0,05$ .

Por fim, a idade, tabagismo e anos-maço aumentam a densidade de vasos sanguíneos do músculo diafragmático em ambos os modelos I e II (Tabela 10).

**Tabela 10.** Análise de regressão multivariada da densidade de vasos sanguíneos (n=88).

	Modelo I: $\beta$ (IC 95%)	Modelo II: $\beta$ (IC 95%)
<b>Características</b>		
Idade	0,0661 (0,0532; 0,0790)*	0,0681 (0,0574; 0,0788)*
Sexo	0,1962 (-0,1524; 0,5449)	-
IMC	0,0146 (-0,0610; 0,0903)	-
Sedentarismo	0,1325 (-0,1810; 0,4462)	-
Tabagismo	1,7000 (1,1020; 2,2979)*	2,4463 (2,1510; 2,7415)*
Período de tabagismo (anos)	0,0102 (-0,0058; 0,0265)	-
Anos-maço	0,0277 (0,0252; 0,0301)*	0,0280 (0,0248; 0,0296)*
<b>Causa do óbito</b>		
Acidente vascular encefálico	-0,0103 (-0,4035; 0,3828)	-
Infarto agudo do miocárdio	-0,1472 (-0,4362; 0,1418)	-
Choque hipovolêmico	-0,2475 (-0,8206; 0,3256)	-
Choque séptico	0,1955 (-0,2974; 0,6905)	-
Pneumonia	-0,0013 (-0,4246; 0,4219)	-
<b>Patologias clinicamente comprovadas</b>		
Demência	0,0228 (-0,4256; 0,4712)	-
Diabetes mellitus	0,2878 (-0,0184; 0,5941)	-
Doença renal crônica	-0,1187 (-0,7815; 0,5445)	-
Hipertensão	-0,0534 (-0,3523; 0,2454)	-

Modelo I: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,8279) entre a densidade de vasos sanguíneos e todas as variáveis. Modelo II: Regressão linear multivariável ( $R^2$  ajustado: 0,8109) entre a densidade de vasos sanguíneos e as variáveis significativas do Modelo I (idade, tabagismo e anos-maço).  $\beta$ : Coeficiente Beta. IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%. \* $p \leq 0,05$ .

## 6. Discussão

Este estudo teve como objetivo avaliar a histologia do músculo diafragma, em diferentes idades, de indivíduos tabagistas e compará-los com o grupo não-tabagista. Devido ao caráter inédito do nosso estudo, utilizamos a literatura disponível para entender os resultados observados a fim de verificar a influência do tabagismo na histopatologia da musculatura diafragmática, levando em consideração fatores clínicos e demográficos.

Quanto as características dos grupos estudados, observamos significância entre a idade dos participantes, onde os tabagistas eram mais jovens que os não-tabagistas. Este fenômeno já foi observado em estudos anteriores onde indivíduos fumantes eram mais jovens que os indivíduos não-fumantes, demonstrando assim a influência do tabagismo na mortalidade e na expectativa de anos de vida perdidos (Baliunas et al., 2007; Doll et al., 2004; Østbye e Taylor, 2004). Ainda, observamos um aumento significativo de óbitos por pneumonia no grupo controle, sendo que estudos consideram a pneumonia como uma das causas mais prevalentes de hospitalização e mortalidade na população idosa (Cillóniz et al., 2018; El-Solh et al., 2001; Yoshikawa et al., 2000).

Referente à análise das fibras musculares, estudos anteriores caracterizaram as fibras musculares normais como fibras homogêneas com formato poligonal e núcleo periférico (Brooke e Kaiser, 1970; Nucci et al., 2019; Scott et al., 2006). No entanto, Scott et al. (2006) observaram fibras anormais no diafragma de pacientes com DPOC que fumavam há mais de 20 anos. Pacientes com DPOC apresentam uma diminuição na área de secção transversal, sugerindo perda de massa muscular, seguida pela migração do núcleo periférico para um núcleo central, aumento de infiltrados inflamatórios que podem levar à degradação das fibras musculares e aumento de fibrose (Marin-Corral et al., 2009; Ottenheijm et al., 2005; Ottenheijm et al., 2006; Ottenheijm et al., 2007; Ottenheijm et al., 2008; Testelmans et al., 2010; Wijnhoven et al., 2006). Entretanto, em nosso estudo, observamos as mesmas características em fumantes, sem comprovação clínica de DPOC, quando comparados ao grupo controle.



Nossos resultados histopatológicos podem ser explicados devido à ação inflamatória e oxidativa do cigarro (Nucci et al., 2020a). Um estudo anterior investigou o estresse oxidativo nos músculos esqueléticos de fumantes e porquinhos-da-índia cronicamente expostos à fumaça de cigarro (Barreiro et al., 2010). Neste estudo, Barreiro e colaboradores (2010) observaram que, quando comparados aos respectivos grupos controle, os níveis de oxidação proteica aumentou no quadríceps de fumantes e pacientes com DPOC e nos músculos de animais expostos à fumaça do cigarro. Além disso, a força muscular do quadríceps foi significativamente reduzida nos fumantes, em comparação com os indivíduos controle (Barreiro et al., 2010). Ademais, Petersen e colaboradores (2007) encontrou taxas mais baixas de síntese proteica na musculatura de tabagistas, bem como maior expressão de MAFbx, responsável por atrofia muscular, quando comparado ao grupo controle, concluindo assim que o tabagismo prejudica os processos de síntese de proteína muscular. Ainda, trabalhos anteriores demonstraram aumento significativo de células inflamatórias (por exemplo, neutrófilos) e mediadores inflamatórios (por exemplo, fator de necrose tumoral alfa, interleucinas e fator nuclear kappa B) em tabagistas (Anto et al., 2002; Lee et al., 2012; Liu et al., 2011; Meng e Yu, 2010; Van der Vaart et al., 2004). Destacamos, em nossos resultados, que fibras com citoplasma atípico geralmente apresentavam infiltrados inflamatórios sugerindo que o aumento destas células inflamatórias e seus mediadores, combinados com danos oxidativos, podem contribuir para a histopatologia do músculo diafragma em fumantes, independente de doenças respiratórias, como por exemplo DPOC (Anto et al., 2002; Oca et al., 2008; Barreiro et al., 2010; Lee et al., 2012; Liu et al., 2011; Meng e Yu, 2010; Nucci et al., 2020a; Petersen et al., 2007; Rom et al. 2012; Van der Vaart et al., 2004).

A disfunção endotelial foi observada em fumantes crônicos, bem como após o tabagismo agudo (Celermajer et al., 1993; Lekakis et al., 1997; Ten e Pinsky, 2002; Zeiher et al., 1995). Em um trabalho recente de nosso grupo, observamos aumento de fator de crescimento endotelial vascular, bem como a densidade de vasos sanguíneos, no músculo diafragma de indivíduos fumantes com carga tabágica acima de 30 anos-maço, sugerindo uma resposta adaptativa para evitar um

estado de hipóxia (Nucci et al., 2020a). Assim, o aumento de vascularização avaliada no presente estudo corrobora com a literatura.

Os pacientes fumantes apresentaram aumento significativo do acúmulo de colágeno quando comparados aos pacientes do grupo controle, indicando fibrose. A lesão muscular é caracterizada por anormalidades estruturais e fibrose, levando à perda de geração de força com um período de recuperação prolongado (Nucci et al., 2019; Rodrigues et al., 1996; Stauber et al., 2000). Entretanto, se a lesão muscular for crônica a regeneração poderá ser comprometida, resultando no acúmulo patológico e de longo prazo de fibras colágenas prejudicando assim as propriedades passivas do músculo diafragmático (Orozco-Levi et al., 2001; Stauber et al., 2000).

Quanto à análise multivariada, dentre os fatores que estão relacionados à histopatologia do músculo diafragma, podemos citar o envelhecimento e o diabetes mellitus. Estudos anteriores demonstraram uma disfunção muscular respiratória relacionada à idade que limita as atividades da vida diária e, portanto, a qualidade de vida de pacientes idosos (Buchman et al., 2008a; Buchman et al., 2008b). Alterações neuromusculares relacionadas à idade podem contribuir para a sarcopenia do músculo diafragma (Prakash e Sieck, 1998), pois o envelhecimento está relacionado à perda de neurônios motores frênicos (Fogarty et al., 2018), que podem aumentar a suscetibilidade à falha da transmissão neuromuscular no diafragma (Fogarty et al., 2019), levando a anormalidades nos miócitos (Deschenes et al., 2010; Greising et al., 2015b). A sarcopenia do diafragma foi previamente relatada como específica do tipo de fibra muscular, com atrofia significativa das fibras do tipo IIX e IIB (Greising et al., 2013; Prezant et al., 1994; Proctor et al., 1995), ou seja, aquelas compreendendo unidades motoras relacionadas à contração rápida/intermediária e à contração rápida, respectivamente (Elliott et al., 2016a). Estudos experimentais com ratos Fisher 344 idosos (24 meses) demonstraram no diafragma que tanto a área transversal das fibras do tipo IIX e IIB quanto a força específica máxima foram reduzidas em 30%, independentemente do sexo dos animais (Elliott et al., 2016b; Khurram et al., 2018). Para corroborar essas

observações, características histológicas negativas, como vistas em nosso estudo, podem estar relacionadas à atrofia muscular, levando à perda da geração de força do diafragma independente do tabagismo (Nucci et al., 2020b).

Quanto a mecânica respiratória, um estudo experimental mostrou aumento na suscetibilidade do diafragma à contração excêntrica com o envelhecimento, levando à lesão das fibras musculares em ratos Sprague-Dawley adultos (84 dias) devido ao tensionamento da musculatura diafragmática (Watchko et al., 1994). No entanto, Khurram e colaboradores (2018) demonstraram em ratos machos e fêmeas que a pressão transdiafragmática, gerada durante comportamentos ventilatórios, não foi prejudicada pela sarcopenia mesmo durante esforços respiratórios vigorosos induzidos por oclusão das vias aéreas. Entretanto, lesões diafragmáticas podem acumular fibras colágenas com o avanço da idade (Rodrigues et al., 1996), o que é consistente com nossos achados (Nucci et al., 2020b). O depósito de colágeno pode comprometer a estrutura do diafragma, levando também a uma diminuição da geração de força passiva neste músculo a longo prazo (Gosselin et al., 1994).

Observa-se que o diabetes mellitus contribuiu de forma significativa no aumento de fibras musculares com núcleo central e citoplasma atípico. Sabe-se que esta patologia ocasiona em disfunção mitocondrial na musculatura, o que resulta em alterações patológicas nos miócitos, contribuindo assim para a perda da força muscular periférica (Kelley et al., 2002; Sayer et al., 2005). Ainda, estudos demonstraram que o sistema respiratório e sua musculatura sofrem negativamente com os efeitos do diabetes mellitus, resultando em redução da capacidade vital forçada e do volume expiratório forçado no primeiro segundo, além de redução das pressões inspiratórias e expiratórias máximas (Klein et al., 2010; Fuso et al., 2012). Entretanto, mais estudos são necessários relacionando o diabetes com o tabagismo na musculatura respiratória a fim de corroborar com os nossos achados.

Para o desenvolvimento deste estudo, não diferenciamos os tipos de fibras musculares. Também não foi possível analisar as vias moleculares responsáveis por injúria muscular. Estes fatores podem representar uma limitação para a discussão de alguns resultados obtidos. Em adição, estudos referenciam uma

associação positiva entre tabagismo e DPOC (Chen et al., 2000; Geijer et al., 2006). No entanto, trabalhos demonstraram que mesmo com carga tabágica acima de 30 anos-maço, indivíduos tabagistas não adquiriram DPOC, sendo inclusive utilizados como grupo de tabagistas controle quando comparados a tabagistas acometidos por DPOC com carga tabágica acima de 30 anos-maço (Kawayama et al., 2016; Aydemir et al., 2019). Assim, estes dados corroboram com os encontrados em nosso estudo, pois os participantes inclusos não apresentavam características clínicas de doenças respiratórias como DPOC mesmo com carga tabágica de  $55,57 \pm 5,30$  anos-maço. Ainda, nossos resultados relacionados ao envelhecimento diafragmático, independente do tabagismo, foram elucidados previamente na literatura tanto em estudos com humanos quanto com modelos animais (Gosselin et al., 1994; Watchko et al., 1994; Polkey et al., 1997; Prakash e Sieck, 1998; Greising et al., 2013; Greising et al., 2015a; Greising et al., 2015b; Elliott et al., 2016b; Fogarty et al., 2018; Fogarty et al., 2019). Ademais, demonstramos que o tabagismo influencia negativamente na histologia do músculo diafragma, sendo que este resultando não havia sido demonstrado na literatura anteriormente. Por fim, levamos em consideração, na análise multivariada, os fatores de confusão a fim de verificar quais destes fatores podem interferir nos parâmetros histopatológicos.

## **7. Conclusão**

Podemos concluir que com o avanço da idade, o diafragma acumula características histopatológicas que podem levar a complicações na mecânica respiratória. Ademais, o tabagismo demonstrou atuar negativamente na histologia diafragmática, sendo que a carga tabágica desempenha papel de suma importância no acréscimo de características histopatológicas neste músculo.

## 8. Referências

Anto RJ, Mukhopadhyay A, Shishodia S, Gairola CG, Aggarwal BB. Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor- $\kappa$ B through phosphorylation and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ : correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis*. 2002;23(9):1511-1518.

Asami S, Manabe H, Miyake J, Tsurudome Y, Hirano T, Yamaguchi R, et al. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis*. 1997;18(9):1763-1766.

Aydemir Y, Aydemir Ö, Şengül A, Güngen AC, Coban H, Taşdemir C, et al. Comparison of oxidant/antioxidant balance in COPD and non-COPD smokers. *Heart Lung*. 2019;48(6):566-569.

Baliunas D, Patra J, Rehm J, Popova S, Kaiserman M, Taylor B. Smoking-attributable mortality and expected years of life lost in Canada 2002: conclusions for prevention and policy. *Chronic Dis Can*. 2007;27(4):154-162.

Barreiro E, Peinado VI, Galdiz JB, Ferrer E, Marin-Corral J, Sanchez F, et al. Cigarette smoke-induced oxidative stress: a role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(4):477-488.

Bonham AC, Chen CY, Mutoh T, Joad JP. Lung C-fiber CNS reflex: role in the respiratory consequences of extended environmental tobacco smoke exposure in young guinea pigs. *Environ Health Perspect*. 2001;109(suppl 4):573-578.

Bonora M, Vizek M. Lung mechanics and end-expiratory lung volume during hypoxia in rats. *J Appl Physiol*. 1999;87(1):15-21.

Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind?. *Arch Neurol*. 1970;23(4):369-379.

Buchman AS, Boyle PA, Wilson RS, Gu L, Bienias JL, Bennett DA. Pulmonary function, muscle strength and mortality in old age. *Mech Ageing Dev.* 2008a;129(11):625-631.

Buchman AS, Boyle PA, Wilson RS, Leurgans S, Shah RC, Bennett DA. Respiratory muscle strength predicts decline in mobility in older persons. *Neuroepidemiology.* 2008b;31(3):174-180.

Calabresi C, Arosio B, Galimberti L, Scanziani E, Bergottini R, Annoni G, Vergani C. Natural aging, expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in rat lung. *Exp Gerontol.* 2007;42(10):1003-1011.

Carvalho JAM, Garcia RA. The aging process in the Brazilian population: a demographic approach. *Cad Saúde Pública.* 2003;19(3):725-733.

Castillo EM, Goodman-Gruen D, Kritz-Silverstein D, Morton DJ, Wingard DL, Barrett-Connor E. Sarcopenia in elderly men and women: the Rancho Bernardo study. *Am J Prev Med.* 2003;25(3):226-231.

Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation.* 1993;88(5):2149-2155.

Chen Y, Breithaupt K, Muhajarine N. Occurrence of chronic obstructive pulmonary disease among Canadians and sex-related risk factors. *J Clin Epidemiol.* 2000;53(7):755-761.

Chong CP, Street PR. Pneumonia in the elderly: a review of the epidemiology, pathogenesis, microbiology, and clinical features. *South Med J.* 2008;101(11):1141-5.

Cillóniz C, Rodríguez-Hurtado D, Torres A. Characteristics and management of community-acquired pneumonia in the era of global aging. *Med Sci (Basel).* 2018;6(2):35.

Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*. 2010;39(4):412-423.

DATASUS. URL: Disponível em <http://www.datasus.gov.br>; acessado em 28 de fevereiro de 2019.

Deschenes MR, Roby MA, Eason MK, Harris MB. Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers. *Exp Gerontol*. 2010;45(5):389-393.

Doherty TJ. Invited review: aging and sarcopenia. *J Appl Physiol*. 2003;95(4):1717-1727.

Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ*. 2004;328(7455):1519.

Dubowitz V, Oldfors A, Sewry CA. Muscle Biopsy: A Practical Approach: Expert Consult [Online and Print]. *Elsevier Health Sciences*. 2013.

El-Solh AA, Sikka P, Ramadan F, Davies J. Etiology of severe pneumonia in the very elderly. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(3):645-651.

Elliott JE, Greising SM, Mantilla CB, Sieck GC. Functional impact of sarcopenia in respiratory muscles. *Respir Physiol Neurobiol*. 2016a;226:137-146.

Elliott JE, Omar TS, Mantilla CB, Sieck GC. Diaphragm muscle sarcopenia in Fischer 344 and Brown Norway rats. *Exp Physiol*. 2016b;101(7):883-894.

Eriksson PO, Eriksson A, Ringqvist M, Thornell LE. The reliability of histochemical fibre typing of human necropsy muscles. *Histochemistry*. 1980;65(3):193-205.

Fagerström K. The epidemiology of smoking. *Drugs*. 2002;62(2):1-9.

Fogarty MJ, Omar TS, Zhan WZ, Mantilla CB, Sieck GC. Phrenic motor neuron loss in aged rats. *J Neurophysiol*. 2018;119(5):1852-1862.



Fogarty MJ, Porras MAG, Mantilla CB, Sieck GC. Diaphragm neuromuscular transmission failure in aged rats. *J Neurophysiol*. 2019;122(1):93-104.

Fragoso CAV, Gill TM. Respiratory impairment and the aging lung: a novel paradigm for assessing pulmonary function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011;67(3):264-275.

Fuso L, Pitocco D, Longobardi A, Zaccardi F, Contu C, Pozzuto C, et al. Reduced respiratory muscle strength and endurance in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012;28(4):370-375.

Geijer RM, Sachs AP, Verheij TJ, Salomé PL, Lammers JWJ, Hoes AW. Incidence and determinants of moderate COPD (GOLD II) in male smokers aged 40–65 years: 5-year follow up. *Br J Gen Pract*. 2006;56(530):656-661.

Gosselin LE, Martinez DA, Vailas AC, Sieck GC. Passive length-force properties of senescent diaphragm: relationship with collagen characteristics. *J Appl Physiol*. 1994;76(6):2680-2685.

Greising SM, Mantilla CB, Gorman BA, Ermilov LG, Sieck GC. Diaphragm muscle sarcopenia in aging mice. *Exp Gerontol*. 2013;48(9):881-887.

Greising SM, Mantilla CB, Medina-Martínez JS, Stowe JM, Sieck GC. Functional impact of diaphragm muscle sarcopenia in both male and female mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015a;309(1):L46-L52.

Greising SM, Ermilov LG, Sieck GC, Mantilla CB. Ageing and neurotrophic signalling effects on diaphragm neuromuscular function. *J Physiol*. 2015b;593(2):431-440.

Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 1997;315(7114):980-988.

Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(14):1194-1210.

Heron M, Sutton PD, Xu J, Ventura SJ, Strobino DM, Guyer B. Annual summary of vital statistics: 2007. *Pediatrics*. 2010;125(1):4-15.

Hochegger B, Meireles GS, Irion K, Zanetti G, Garcia E, Moreira J, Marchiori E. The chest and aging: radiological findings. *J Bras Pneumol*. 2012;38(5):656-665.

Houston MS, Silverstein MD, Suman V. Risk factors for 30-day mortality in elderly patients with lower respiratory tract infection: community-based study. *Arch Intern Med*. 1997;157(19):2190-2195.

Hunninghake GW, Crystal RG. Cigarette smoking and lung destruction: accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis*. 1983;128(5):833-838.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. URL: Disponível em <http://www.ibge.gov.br>; acessado em 7 de Fevereiro de 2021.

Jacob Filho W, Fontinele RG, de Souza RR. Reference database of lung volumes and capacities in Wistar rats from 2 to 24 months. *Curr Aging Sci*. 2014;7(3):220-228.

Janssens JP. Aging of the respiratory system: impact on pulmonary function tests and adaptation to exertion. *Clin Chest Med*. 2005;26(3):469-484.

Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM., et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(23):1672-1694.

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11(4):447-455.

Kalache A. Population aging and health information from the National Household Sample Survey: contemporary demands and challenges. Postscript. *Cad Saúde Pública*. 2007;23(10):2503-2505.

Kampa M, Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environ Pollut*. 2008;151(2):362-367.

Kawayama T, Kinoshita T, Matsunaga K, Kobayashi A, Hayamizu T, Johnson M, Hoshino T. Responsiveness of blood and sputum inflammatory cells in Japanese COPD patients, non-COPD smoking controls, and non-COPD nonsmoking controls. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:295.

Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(10):2944-2950.

Khurram OU, Fogarty MJ, Sarrafian TL, Bhatt A, Mantilla CB, Sieck GC. Impact of aging on diaphragm muscle function in male and female Fischer 344 rats. *Physiol Rep*. 2018;6(13):e13786.

Klein OL, Krishnan JA, Glick S, Smith LJ. Systematic review of the association between lung function and Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2010;27(9):977-987.

Lee JS, Auyeung TW, Kwok T, Lau EM, Leung PC, Woo J. Associated factors and health impact of sarcopenia in older Chinese men and women: a cross-sectional study. *Gerontology*. 2007;53(6):404-410.

Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res*. 2012;91(2):142-149.

Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C, Nanas J, Kontoyannis D, Stamatelopoulos S, Mouloupoulos S. Effect of acute cigarette smoking on endothelium-dependent brachial artery dilatation in healthy individuals. *Am J Cardiol*. 1997;79(4):529-531.

Liu Q, Xu WG, Luo Y, Han FF, Yao XH, Yang TY, et al. Cigarette smoke-induced skeletal muscle atrophy is associated with up-regulation of USP-19 via p38 and ERK MAPKs. *J Cell Biochem*. 2011;112(9):2307-2316.

MacCoun R, Perlmutter S. Blind analysis: Hide results to seek the truth. *Nature*. 2015;526(7572):187.

Mandarin-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003;75(4):469-486.

Manzetti S, van der Spoel ER, van der Spoel D. Chemical properties, environmental fate, and degradation of seven classes of pollutants. *Chem Res Toxicol*. 2014;27(5):713-737.

Marin-Corral J, Minguella J, Ramírez-Sarmiento AL, Hussain SNA, Gea J, Barreiro E. Oxidised proteins and superoxide anion production in the diaphragm of severe COPD patients. *Eur Respir J*. 2009;33(6):1309-1319.

Mendes TAB. Prevalência de doenças crônicas e a utilização dos serviços de saúde por idosos residentes no Município de São Paulo. Tese de Doutorado em Medicina Preventiva. Universidade de São Paulo, 2010.

Meng SJ, Yu LJ. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int J Mol Sci*. 2010;11(4):1509-1526.

Meyer KC, Rosenthal NS, Soergel P, Peterson K. Neutrophils and low-grade inflammation in the seemingly normal aging human lung. *Mech Ageing Dev*. 1998;104(2):169-181.

Meyers DG, Neuberger JS, He J. Cardiovascular effect of bans on smoking in public places: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(14):1249-1255.

Nucci RAB, Jacob-Filho W, Busse AL, Maifrino LBM, de Souza RR. Anatomopathological Assessment of the Diaphragm in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Sections. *J Morphol Sci*. 2018;35(3):173-176.

Nucci RAB, de Souza RR, Suemoto CK, Busse AL, Maifrino LBM, Pasqualucci CA, et al. Cigarette Smoking Impairs the Diaphragm Muscle Structure of Patients without Respiratory Pathologies: An Autopsy Study. *Cell Physiol Biochem*. 2019;53:648-655.

Nucci RAB, Maifrino LBM, Busse AL, de Souza RR, Pasqualucci CA, Anaruma CA, et al. Evaluation of the Diaphragm Muscle Remodeling, Inflammation, Oxidative Stress and Vascularization in Smokers: An Autopsy Study. *Cell Physiol Biochem*. 2020a;54(4):567-576.

Nucci RAB, de Souza RR, Suemoto CK, Busse AL, Maifrino LBM, Anaruma CA, et al. Diaphragm muscle structure in the elderly: Findings from an autopsy study. *Acta Histochem.* 2020b;122(2):151487.

Oca MM, Loeb E, Torres SH, De Sanctis J, Hernández N, Tálamo C. Peripheral muscle alterations in non-COPD smokers. *Chest.* 2008;133(1):13-18.

Orozco-Levi M, Lloreta J, Minguella J, Serrano S, Broquetas JM, Gea J. Injury of the human diaphragm associated with exertion and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(9):1734-1739.

Østbye T, Taylor DH. The effect of smoking on years of healthy life (YHL) lost among middle-aged and older Americans. *Health Serv Res.* 2004;39(3):531-552.

Ottenheijm CA, Heunks LM, Sieck GC, Zhan WZ, Jansen SM, Degens H, de Boo T, Dekhuijzen PN. Diaphragm dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(2):200-205.

Ottenheijm CA, Heunks LM, Li YP, Jin B, Minnaard R, Van Hees HW, Dekhuijzen PR. Activation of the ubiquitin–proteasome pathway in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(9):997-1002.

Ottenheijm CA, Heunks LM, Dekhuijzen PR. Diaphragm muscle fiber dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: toward a pathophysiological concept. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(12):1233-1240.

Ottenheijm CA, Heunks LM, Dekhuijzen RP. Diaphragm adaptations in patients with COPD. *Resp Res.* 2008;9(1):12.

Pengelly LD, Alderson AM, Milic-Emili J. Mechanics of the diaphragm. *J Appl Physiol.* 1971;30(6):797-805.

Petersen AMW, Magkos F, Atherton P, Selby A, Smith K, Rennie MJ, et al. Smoking impairs muscle protein synthesis and increases the expression of myostatin and MAFbx in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(3):843-848.

Polkey MI, Harris ML, Hughes PD, Hamnegård CH, Lyons D, Green M, Moxham J. The contractile properties of the elderly human diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(5):1560-1564.

Poole DC, Sexton WL, Farkas GA, Powers SK, Reid MB. Diaphragm structure and function in health and disease. *Med Sci Sports Exerc*. 1997;29(6):738-754.

Prakash YS, Sieck GC. Age-related remodeling of neuromuscular junctions on type-identified diaphragm fibers. *Muscle Nerve*. 1998;21(7):887-895.

Prezant DJ, Richner B, Aldrich TK, Valentine DE, Gentry EI, Cahill J. Effect of long-term undernutrition on male and female rat diaphragm contractility, fatigue, and fiber types. *J Appl Physiol*. 1994;76(4):1540-1547.

Proctor DN, Sinning WE, Walro JM, Sieck GC, Lemon PW. Oxidative capacity of human muscle fiber types: effects of age and training status. *J Appl Physiol*. 1995;78(6):2033-2038.

Rodrigues CJ, Rodrigues Júnior AJ, Bohm GM. Effects of aging on muscle fibers and collagen content of the diaphragm: a comparison with the rectus abdominis muscle. *Gerontology*. 1996;42(4):218-228.

Rom O, Kaisari S, Aizenbud D, Reznick AZ. Sarcopenia and smoking: a possible cellular model of cigarette smoke effects on muscle protein breakdown. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1259(1):47-53.

Sayer AA, Dennison EM, Syddall HE, Gilbody HJ, Phillips DI, Cooper C. Type 2 diabetes, muscle strength, and impaired physical function: the tip of the iceberg?. *Diabetes Care*. 2005;28(10):2541-2542.

Scott A, Wang X, Reid WD. Increased injury and intramuscular collagen of the diaphragm in COPD: autopsy observations. *Eur Respir J*. 2006;27(1):51-59.

SEADE – Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados. URL: Disponível em <https://www.seade.gov.br/>; acessado em 7 de Fevereiro de 2021.

Stauber WT, Smith CA, Miller GR, Stauber FD. Recovery from 6 weeks of repeated strain injury to rat soleus muscles. *Muscle Nerve*. 2000;23(12):1819-1825.

Steffl M, Bohannon RW, Petr M, Kohlikova E, Holmerova I. Relation between cigarette smoking and sarcopenia: meta-analysis. *Physiol Res*. 2015;64(3):419-426.

Suriyonplengsaeng C, Dejthevaporn C, Khongkhatithum C, Sanpapant S, Tubthong N, Pinpradap K, et al. Immunohistochemistry of sarcolemmal membrane-associated proteins in formalin-fixed and paraffin-embedded skeletal muscle tissue: a promising tool for the diagnostic evaluation of common muscular dystrophies. *Diagn Pathol*. 2017;12(1):19.

Szulc P, Duboeuf F, Marchand F, Delmas PD. Hormonal and lifestyle determinants of appendicular skeletal muscle mass in men: the MINOS study. *The Am J Clin Nutr*. 2004;80(2):496-503.

Ten VS, Pinsky DJ. Endothelial response to hypoxia: physiologic adaptation and pathologic dysfunction. *Curr Opin Crit Care*. 2002;8(3):242-250.

Testelmans D, Crul T, Maes K, Agten A, Crombach M, Decramer M, Gayan-Ramirez G. Atrophy and hypertrophy signalling in the diaphragm of patients with COPD. *Eur Respir J*. 2010;35(3):549-556.

Tolep K, Higgins N, Muza S, Criner G, Kelsen SG. Comparison of diaphragm strength between healthy adult elderly and young men. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(2):677-682.

US Department of Health and Human Services et al. The health consequences of smoking: a report of the Surgeon General. Atlanta, GA. *US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion*. Office on Smoking and Health. 2004.

Van der Vaart H, Postma DS, Timens W, Ten Hacken NHT. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*. 2004;59(8):713-721.

Van Ee CA, Chasse AL, Myers BS. Quantifying skeletal muscle properties in cadaveric test specimens: effects of mechanical loading, postmortem time, and freezer storage. *J Biomech Eng.* 2000;122(1):9-14.

Ward SR, Lieber RL. Density and hydration of fresh and fixed human skeletal muscle. *J Biomech.* 2005;38(11):2317-2320.

Watchko JF, Johnson BD, Gosselin LE, Prakash YS, Sieck GC. Age-related differences in diaphragm muscle injury after lengthening activations. *J Appl Physiol.* 1994;77(5):2125-2133.

Weinert BT, Timiras PS. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol.* 2003;95(4):1706-1716.

WHO - World Health Organization. Tobacco and its environmental impact: an overview. *World Health Organization.* 2017.

Wijnhoven JH, Janssen AJM, Van Kuppevelt TH, Rodenburg RJT, Dekhuijzen PNR. Metabolic capacity of the diaphragm in patients with COPD. *Respir Med.* 2006;100(6):1064-1071.

Yoshikawa TT, Marrie TJ. Community-acquired pneumonia in the elderly. *Clin Infect Dis.* 2000;31(4):1066-1078.

Zeiger AM, Schächinger V, Minners J. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation.* 1995;92(5):1094-1100.



## ANEXOS

## Anexo I. Aprovação do Comitê de Ética

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 2.209.363

gestor indireto do SVO, mas seria importante demonstrar o aval da instituição.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nenhuma

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_890069.pdf	24/07/2017 09:06:11		Aceito
Outros	questionarioatualizado.docx	24/07/2017 09:05:53	Wilson Jacob Filho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodoutoradoatualizado.docx	24/07/2017 09:05:36	Wilson Jacob Filho	Aceito
Outros	cadastroonline.pdf	29/06/2017 16:42:22	Wilson Jacob Filho	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	29/06/2017 16:42:05	Wilson Jacob Filho	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 09 de Agosto de 2017

Assinado por:  
Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira  
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 2.209.383

gestor indireto do SVO, mas seria importante demonstrar o aval da instituição.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nenhuma

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES BÁSICAS_DO_PROJETO_890069.pdf	24/07/2017 09:06:11		Aceito
Outros	questionarioatualizado.docx	24/07/2017 09:05:53	Wilson Jacob Filho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodoutoradoatualizado.docx	24/07/2017 09:05:36	Wilson Jacob Filho	Aceito
Outros	cadastroonline.pdf	29/06/2017 16:42:22	Wilson Jacob Filho	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	29/06/2017 16:42:05	Wilson Jacob Filho	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 09 de Agosto de 2017

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira  
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

**Anexo II.** Permissão para utilizar o LEMI da Universidade São Judas Tadeu

À faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Eu, professor Dr. Romeu Rodrigues de Souza, declaro para os devidos fins que estou ciente das necessidades de infraestrutura para realização do projeto de doutorado do professor Ricardo Aparecido Baptista Nucci no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob a orientação do professor Dr. Wilson Jacob Filho. Desta forma declaro que o aluno terá acesso aos equipamentos necessários para a realização do referido projeto na Universidade São Judas Tadeu, da qual sou professor do curso de Pós-graduação em Ciências do Envelhecimento.



Dr. Romeu Rodrigues de Souza (Colaborador)




Ciente: Ricardo Aparecido Baptista Nucci (Doutorando)

São Paulo, 11 de Junho de 2018

**Anexo III.** Lista de publicações decorrentes da Tese

1. **Nucci, R.A.B.**, Jacob-Filho, W., Busse, A.L., Maifrino, L.B.M., de Souza, R.R. (2018). Anatomopathological assessment of the diaphragm in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Journal of Morphological Sciences*, 35(03), 173-176. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0038-1673611>
2. **Nucci, R.A.B.**, de Souza, R.R., Suemoto, C.K., Busse, A.L., Maifrino, L.B.M., Pasqualucci, C.A., Anaruma, C.A., Jacob-Filho, W. (2019). Cigarette smoking impairs the diaphragm muscle structure of patients without respiratory pathologies: An autopsy study. *Cellular Physiology and Biochemistry* (JCR 2017: 5.5), 53, 648-655. DOI: <http://dx.doi.org/10.33594/000000163>
3. **Nucci, R.A.B.**, de Souza, R. R., Suemoto, C.K., Busse, A.L., Maifrino, L.B.M., Anaruma, C.A., Pasqualucci, C.A., Jacob-Filho, W. (2020). Diaphragm muscle structure in the elderly: Findings from an autopsy study. *Acta Histochemica* (JCR 2019: 2.107), 122, 151487. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.151487>
4. **Nucci, R.A.B.**; Maifrino, L.B.M. ; Busse, A.L. ; Souza, R.R. ; Pasqualucci, C.A. ; Anaruma, C.A. ; Leite, R.E.P. ; Rodriguez, R.D. ; Suemoto, C.K. ; Jacob-Filho, W. (2020). Evaluation of the diaphragm muscle remodeling, inflammation, oxidative stress and vascularization in smokers: An autopsy study. *Cellular Physiology and Biochemistry* (JCR 2017: 5.5), 54, 567-576. DOI: <http://dx.doi.org/10.33594/000000240>

## Anexo IV. Recibo digital Turnitin



### Recibo digital

Esse recibo confirma que o seu documento foi recebido por **Turnitin**. Abaixo você encontrará a informação do recibo referente ao seu envio.

A primeira página do seu documento está exibida abaixo.

Autor do material:	Ricardo Aparecido Baptista Nucci
Título do Trabalho:	Autochecagem Turnitin
Título do envio:	Tese de Doutorado
Nome do arquivo:	0.Arquivo_Tese.pdf
Tamanho de arquivo:	1.06M
Contagem de páginas:	61
Contagem de palavras:	11,838
Contagem de caracteres:	67,703
Data de envio:	11-mar-2022 12:48PM (UTC-0300)
Identificação do Envio:	1593950555

RICARDO APARECIDO BAPTISTA NUCCI

Análise histomorfométrica do músculo diafragma em diferentes idades: um estudo de correlação citopatológica da cage biológica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências  
Programa de Pós-graduação  
Orientador: Prof. Dr. Wilson Jacari Filho

São Paulo  
2022

Direitos Autorais Turnitin 2022. Todos os direitos reservados.