

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE – MESTRADO

GABRIELLA LOPES CAPPELLARO

**A INFLUÊNCIA DA PROGRAMAÇÃO FETAL POR OBESIDADE E
PERIODONTITE NO MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DE RATOS
*Wistar***

CASCAVEL-PR
(Fevereiro/2023)

GABRIELLA LOPES CAPPELLARO

**A INFLUÊNCIA DA PROGRAMAÇÃO FETAL POR OBESIDADE E
PERIODONTITE NO MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DE RATOS
*Wistar***

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa De Pós-Graduação em Biociências e Saúde – Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Marcia Miranda
Torrejais

CASCAVEL-PR
(Fevereiro/2023)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Lopes Cappellaro , Gabriella
A INFLUÊNCIA DA PROGRAMAÇÃO FETAL POR OBESIDADE E
PERIODONTITE NO MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DE RATOS
WISTAR / Gabriella Lopes Cappellaro ; orientadora Marcia
Miranda Torrejais. -- Cascavel, 2023.
84 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em BioCiências
e Saúde, 2023.

1. Desenvolvimento fetal. 2. Doença periodontal. 3.
Glutamato monossódico . 4. Musculoesquelético. I. Torrejais,
Marcia Miranda , orient. II. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Reitoria
CNPJ 78.680.337/0001-84
Rua Universitária, 1619, Jardim Universitário
Tel: (45) 3220-3000 - Fax: (45) 3225-4590 - www.unioeste.br
CEP: 85819-110 - Cx. P.: 701
Cascavel - PARANÁ



GABRIELLA LOPES CAPPELLARO

A influência da programação fetal por obesidade e periodontite no músculo extensor longo dos dedos em ratos Wistar.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biociências e Saúde, área de concentração Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde, linha de pesquisa Fatores que influenciam a morfofisiologia orgânica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Marcia Miranda Torrejais

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Carlos Augusto Nassar

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Adriano Polican Ciena

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP (UNESP)

Cascavel, 27 de fevereiro de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela minha vida, por abençoar e iluminar meu caminho, dando-me saúde, sabedoria, força e coragem.

Aos meus pais, Valdecir e Claudinéia, agradeço pelo amor incondicional, pelo carinho, pelo incentivo em todos os momentos da minha vida. Vocês me ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos. Eu reconheço todos os esforços que fazem e por isso dedico todas as conquistas da minha vida a vocês.

Ao meu irmão e à minha cunhada, Eduardo e Heloisa. Mesmo estando a quilômetros de distância, vocês estão sempre me transmitindo amor, apoio, e celebrando cada conquista comigo. Sinto saudades de vocês todos os dias.

A todos os meus familiares, meus avós, padrinhos, tios, primos, por todo apoio. Agradeço a minha tia Carina, que está sempre ao meu lado, apoiando-me e me ajudando em tudo.

A minha orientadora, professora Dr^a. Marcia Miranda Torrejais, agradeço por todo o conhecimento, pelas orientações, pela confiança que depositou em mim, pela compreensão e paciência.

A todos os amigos que me acompanham desde o começo da minha vida acadêmica, e aos que eu fiz ao longo do caminho, agradeço por estarem comigo celebrando cada momento.

Aos amigos que fiz durante o mestrado: Rafaella, Daniele, Mikael, Fernanda, Letícia, Amanda, Thaís, Lilian, Flávia, Ana Retameiro. Vocês foram essenciais nesse processo.

Agradeço a todos os professores do Programa de Mestrado em Biociências e Saúde, que contribuíram com o trabalho, nas dúvidas, nas bancas, sou grata por tudo.

RESUMO

CAPPELLARO, L. G. **A influência da Programação Fetal por Obesidade e Periodontite no Músculo Extensor Longo dos Dedos de Ratos *Wistar***. 84 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2023.

A programação fetal (PF) refere-se a mudanças fisiológicas e metabólicas no feto, após a ocorrência de estímulos ou insultos durante desenvolvimento intrauterino, predispondo-o a desenvolver doenças crônicas na vida adulta. Esses insultos podem ser doenças maternas, principalmente quando apresentam quadro inflamatório sistêmico. Contudo, são pouco esclarecidos os efeitos sobre o tecido muscular esquelético na prole. Este estudo buscou analisar se a PF, causada pela obesidade e/ou periodontite (PE), causa alterações morfológicas e morfométricas nas fibras musculares, no tecido conjuntivo e nas junções neuromusculares (JNMs), no músculo extensor longo dos dedos (ELD) da prole adulta de ratas *Wistar*. Para a realização da pesquisa, foram obtidas 20 ratas *Wistar* prenhas e, após o nascimento da geração parental (P), as fêmeas foram distribuídas em dois grupos, de forma aleatória. Aos cinco dias de vida, um grupo recebeu a indução da obesidade, por meio de injeções de glutamato monossódico (MSG=30) e o outro grupo recebeu salina hiperosmótica (n=30). Aos 70 dias de idade, 15 ratas de cada grupo receberam a indução da periodontite, por meio da ligadura. A geração P foi composta por 60 ratas, sendo distribuídas em quatro grupos, conforme a indução das doenças. Aos 77 dias de idade, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados para a constatação das doenças. Posteriormente, foi realizado o cruzamento com os ratos controle, constituindo a geração F1, composta por 28 ratos machos, formando quatro grupos, sendo: controle (CTL-F1), periodontite (PE-F1), MSG (MSG-F1) e MSG com periodontite (MSG PE-F1). Com 90 dias de idade, os animais receberam a indução da periodontite e, com 120 dias, foram eutanasiados e o músculo ELD foi coletado, armazenado e processado para as análises morfológicas e morfométricas das fibras musculares por: coloração de Hematoxilina-Eosina, quantificação do tecido conjuntivo, técnica de Tricômico de Masson, estudo das JNMs, reação de Esterase Inespecífica e quantificação da atividade da enzima colinesterase (ChE). A análise estatística foi realizada utilizando o *software XLSTAT 2014.5.03* e os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão da média, sendo que os valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Na análise dos parâmetros macroscópicos da prole, os animais do grupo MSG PE-F1 mostraram redução no peso corporal, comparados ao grupo PE-F1. O grupo MSG PE-F1 apresentou redução nas gorduras retroperitoneal e periepídidimal e no comprimento do músculo ELD em relação aos grupos MSG-F1 e PE-F1. Entretanto as medidas de comprimento nasoanal, o índice de Lee e o peso do músculo ELD não tiveram diferenças estatísticas entre os grupos estudados. Na morfologia das fibras musculares, foi observado fibras com núcleo central e formato amorfo com diferença tintorial nos grupos MSG-F1, PE-F1 e MSG PE-F1. Já na morfometria, o grupo PE-F1 apresentou redução na densidade das fibras e aumento da relação capilar/fibra em comparação ao grupo CTL-F1. No tecido conjuntivo, o grupo MSG-F1 teve aumento em comparação ao grupo CTL-F1 e o grupo MSG PE-F1 mostrou aumento em relação ao grupo PE-F1. As JNMs e atividade de enzima ChE, não tiveram diferenças significativas. O estudo revelou que a PF provocada por obesidade e PE

mostrou alterações nos parâmetros corporais da prole, nas fibras musculares e no tecido conjuntivo, podendo causar prejuízos na função muscular.

Palavras-Chaves: Desenvolvimento fetal; doença periodontal; glutamato monossódico e musculoesquelético.

ABSTRACT

CAPPELLARO, L. G. **The Influence of Fetal Programming by Obesity and Periodontitis on the Extensor Digitorum Longus in Wistar Rats** 83 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2023.

Fetal programming (FP) refers to physiological and metabolic changes in the fetus, after the occurrence of stimuli or insults during intrauterine development, predisposing it to develop chronic diseases in adult life. Such insults may be maternal diseases, especially when they present a systemic inflammatory condition. However, the effects on skeletal muscle tissue in offspring are unclear. This study aimed to analyze whether FP caused by obesity and/or periodontitis (PD) causes morphological and morphometric changes in muscle fibers, connective tissue, and neuromuscular junctions (NMJs) in the extensor digitorum longus (EDL) muscle of the adult offspring of Wistar rats. In order to carry out the research, 20 pregnant Wistar rats were obtained, after the birth of the parental generation (P), the females were randomly distributed into two groups, at five days of life one group received the induction of obesity through injections of glutamate monosodium (MSG=30) the other group received hyperosmotic saline (n=30). At 70 days of age, 15 rats from each group received periodontitis induction through ligation. The P generation consisted of 60 female rats, divided into four groups according to the disease induction. At 77 days of age, five animals from each group were euthanized for disease verification. Subsequently, the crossing with control rats was carried out, constituting the F1 generation, composed of 28 male rats, forming four groups, namely: control (CTL-F1), periodontitis (PD-F1), MSG (MSG-F1) and MSG with periodontitis (MSG PD-F1). At 90 days of age, the animals received periodontitis induction and at 120 days they were euthanized and the EDL muscle was collected, stored, and processed for morphological and morphometric analyzes of muscle fibers by Hematoxylin-Eosin staining, quantification of connective tissue by the technique of Masson's Trichrome, study of the NMJs by the Nonspecific Esterase reaction, and quantification of cholinesterase (ChE) enzyme activity. Statistical analysis was performed using the XLSTAT 2014.5.03 software, the results obtained were expressed as mean \pm standard deviation of the mean, values with $p < 0.05$ were considered significant. In the analysis of the macroscopic parameters of the offspring, the animals in the MSG PD-F1 group showed a reduction in body weight compared to the PD-F1 group. The MSG PD-F1 group showed a reduction in retroperitoneal and periepididymal fat and EDL muscle length compared to the MSG-F1 and PD-F1 groups. However, nasoanal length measurements, Lee index and EDL muscle weight did not show statistical differences between the trained groups. In the morphology of the muscle fibers, fibers with a central nucleus and amorphous format were observed with dye differences in the MSG-F1, PD-F1, and MSG PD-F1 groups. In terms of morphometry, the PD-F1 group showed a reduction in fiber density and an increase in the capillary/fiber ratio compared to the CTL-F1 group. In connective tissue the MSG-F1 group had an increase compared to the CTL-F1 group, and the MSG PD-F1 group showed an increase compared to the PD-F1 group. NMJs and ChE enzyme activity did not differ significantly. The study revealed that the FP caused by obesity and PD, showed changes in the body parameters of the offspring, in muscle fibers and connective tissue, which may cause damage to muscle function.

Keywords: Fetal development; periodontal disease; monosodium glutamate and skeletal muscle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem ilustrativa de uma comparação entre as das estruturas saudáveis e as que são lesionadas na DP.....	22
Figura 2 - Esquema demonstrando os componentes da célula do músculo estriado esquelético.	25
Figura 3 - Esquema demonstrando as características das fibras ao microscópio de luz	26
Figura 4 - Demonstração da estrutura de uma junção neuromuscular.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina
ATP - Adenosinatrifosfato
CNA - Comprimento nasoanal
Cm - Centímetros
DP - Doença periodontal
ELD - Extensor longo dos dedos
JNMs - Junções neuromusculares
µm - Micrômetro
MSG - Glutamato monossódico
mm - Mensuração do comprimento
OH - Obesidade hipotalâmica
OMS - Organização Mundial da Saúde
PE - Periodontite
PF - Programação fetal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Programação fetal	16
3.2 Obesidade	18
3.3 Obesidade hipotalâmica	19
3.4 Doença periodontal.....	21
3.5 Músculo estriado esquelético e JNMs.....	24
3.6 Efeitos da obesidade e periodontite no músculo estriado esquelético	28
ARTIGO CIENTÍFICO	30
CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES FINAIS.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO A - PARECER DO CÔMITE DE ÉTICA	74
ANEXO B – NORMAS DA REVISTA	75

1. INTRODUÇÃO

Estudos têm demonstrado que a nutrição e o estilo de vida dos pais pré e pós-natal influenciam a saúde dos filhos na vida adulta (CALKINS, DEVASKAR, 2011; KOLETZO *et al.*, 2011). Nas últimas décadas, pesquisas sobre a programação fetal (PF) verificaram que períodos críticos como o pré-concepcional, o pré-natal e o neonatal são fundamentais para moldar o risco futuro às doenças não transmissíveis, pois são caracterizados por terem alto grau de plasticidade (BARKER, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2007; PERVANIDOU, CHROUSOS, 2012), podendo promover consequências nas gerações seguintes, já na vida pós-natal ou permanecer silenciadas até a vida adulta (CAROLAN-OLAH; DUARTE-GARDEA; LECHUGA, 2015).

A programação fetal (PF) pode ser causada por insultos como: doenças maternas e fetais, alterações nutricionais, intervenções médicas, tabagismo, hipertensão, entre outros (MARCINIAK *et al.*, 2017). Os períodos críticos do desenvolvimento tendem a ser os mais importantes para influenciar o crescimento tardio da adiposidade (MATTERA *et al.*, 2019).

Desse modo, a questão nutricional tem despertado preocupação, considerando o aumento na incidência de obesidade na população mundial (URRUTIA-PEREIRA; SOLÉ, 2015). Com esse aumento, a obesidade se tornou um grave problema de saúde pública. No Brasil cerca de 50% das pessoas estão com sobrepesos, sendo um importante fator de risco para o desenvolvimento de comorbidades, como doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, doenças gastrointestinais, acidentes vasculares cerebrais e doença periodontal (DP) (ASHLEY; KANNEL 1974; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Afetando também economicamente a sociedade, pois seu tratamento e o das doenças associadas têm custo anual de aproximadamente 3,6 bilhões para o Sistema Único de Saúde (BAHIA; ARAÚJO, 2014; WHO, 2018).

A causa da obesidade é relacionada principalmente ao consumo excessivo de alimentos calóricos e ao sedentarismo. Entretanto, pesquisas mostram que a etiologia pode ser relacionada também à predisposição dos pais, visto que filhos de pais obesos têm maior predisposição para o desenvolvimento da doença (CATALANO, 2013; GHAFFARI *et al.*, 2005). Além disso, é caracterizada pela inflamação sistêmica de

baixo grau no tecido adiposo, o que é causado pela ativação do sistema imune, levando o organismo a um estado pró inflamatório e ao estresse oxidativo local e sistêmico. Essa inflamação sistêmica se relaciona ao desenvolvimento de doenças crônicas, como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, hepáticas, doenças periodontais, entre outras (BRANDELERO *et al.*, 2012; MARSEGLIA *et al.*, 2015).

A DP tem afetado também grande parte da população mundial, sendo caracterizada como uma doença inflamatória e infecciosa que afeta as estruturas de suporte dos dentes, em decorrência da interação entre as bactérias e da resposta imune do hospedeiro (GENCO *et al.*, 2005; PILHSTROM *et al.*, 2005). O sistema imune do hospedeiro causa a destruição dos tecidos de suporte para fins de proteção, através da síntese e da liberação de citocinas, de mediadores pró-inflamatórios e de metaloproteinases e a forma mais grave da doença é chamada de periodontite (PE) (DIAS *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2008).

Pesquisas científicas sugerem que a obesidade contribui efetivamente para a gravidade da PE (DAHIYA; KAMAL; GUPTA, 2012; DE CASTILHOS *et al.*, 2012). Uma explicação plausível para a relação entre elas é o aumento da concentração plasmática das citocinas pró-inflamatórias. A liberação das citocinas pelo tecido adiposo e pelos hormônios pró-inflamatórios podem causar indução do processo inflamatório e distúrbio oxidativo, acarretando uma fisiopatologia similar entre as duas patologias (MOURA-CREC *et al.*, 2014). O quadro inflamatório presente pode causar danos aos tecidos, contudo, faltam estudos que esclareçam se as doenças associadas promovem efeitos sobre a saúde do tecido muscular.

Sabendo que a saúde do músculo estriado esquelético é tão importante para o indivíduo, principalmente para o sistema locomotor, é relevante entender seu funcionamento, pois possui propriedades de adaptação e plasticidade que, quando expostos a estímulos internos e externos, principalmente fisiológicos, produz respostas a esses insultos. Para manutenção estrutural desse tecido, é necessário o equilíbrio da síntese e a degradação proteica que, quando associada a fatores como exercício físico, modificações hormonais e doenças, entre outros, podem afetar a saúde do indivíduo (CARDOZO; GRAHAM, 2017; FRONTERA; OCHALA 2015). É interessante ressaltar que os músculos que apresentam predominantemente fibras do tipo II apresentam maior propensão a agravos nutricionais, como o músculo extensor longo dos dedos (ELD) (WARD; STICKLAND, 1991), que foi utilizado neste estudo.

Na pesquisa de Leite *et al.* (2017), induziu-se a PE em ratos *Wistar*, no músculo sóleo, e foi mostrado que a intensificação dos distúrbios inflamatórios pode acarretar alterações nos aspectos histomorfométricos do tecido muscular, levando ao comprometimento da capacidade funcional e estrutural. Além disso, no estudo de Boaretto *et al.* (2020), verificaram-se os efeitos da obesidade induzida através do glutamato monossódico (MSG) em ratos *Wistar*; no músculo sóleo, observaram-se alterações degenerativas das fibras musculares, desorganização tecidual e também a presença de infiltrado inflamatório.

Diante ao exposto, é necessário o desenvolvimento de estudos que auxiliem no entendimento da relação entre a obesidade e a PE na saúde do tecido muscular e também é necessário verificar se a PF promove efeitos na prole, sabendo que estímulos na fase intrauterina podem modificar a saúde dos filhos ao longo da vida. Portanto, a hipótese desta pesquisa é se a PF por obesidade e PE provoca alterações morfológicas e morfométricas no músculo ELD da prole adulta de ratas *Wistar*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar se a PF causada pela obesidade e/ou PE causa alterações morfológicas e morfométricas nas fibras musculares, no tecido conjuntivo e nas junções neuromusculares (JNMs) do músculo ELD da prole adulta de ratas *Wistar*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Analisar o peso corpóreo, comprimento nasoanal (CNA) e peso das gorduras retroperitoneal e periepídimal;
2. Verificar o peso e comprimento do músculo ELD;
3. Mensurar a área e densidade das fibras musculares, o número de núcleos, capilares, a relação núcleo/fibra e a capilar/fibra;

4. Avaliar a porcentagem de tecido conjuntivo;
5. Realizar a morfometria da área - diâmetros maior e menor das JNMs;
6. Examinar a atividade das enzimas colinesterase.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Programação fetal

Descrito inicialmente por Lucas (1991), o termo programação se refere à ocorrência de mudanças permanentes e de longo prazo na função ou na estrutura de um organismo, em decorrência de estímulos ou insultos em períodos críticos da vida (BARKER, 2007; HALES; BARKER, 1992). Nesta mesma época, o epidemiologista David Barker investigou o aumento do risco de doença coronariana na vida adulta, associado com o baixo peso após nascimento (MARCINIAK *et al.*, 2017; BARKER, 2007; CALKINS; DEVASKAR, 2011).

O período em que esses insultos podem ocorrer incluem desde a vida pré-natal até a pós-natal, a infância até a adolescência, por serem estágios caracterizados por um alto grau de plasticidade (SILVEIRA *et al.*, 2007). A PF pode ser desencadeada por diversos insultos, tais como doenças maternas e fetais, alterações nutricionais como a falta ou excesso de nutrientes, intervenções médicas, tabagismo, hipertensão, entre outros (MARCINIAK *et al.*, 2017; PADMANABHAN; CARDOSO; PUTTABYATAPPA, 2016). A grande maioria dos fatores são determinados pela função placentária inadequada. Quando ocorrem complicações na gravidez, o transporte mãe-feto fornecido por transportadores placentários, enzimas e hormônios são interrompidos, o que resulta em redução do substrato para o feto (SALAM; DAS; BHUTTA, 2014; MARCINIAK *et al.*, 2017; KOLETZO *et al.*, 2011).

Essa exposição do feto à ocorrência de perturbações modifica o seu desenvolvimento através de fatores conhecidos como mecanismos epigenéticos, sendo então alterações moleculares ocorridas no DNA ou em proteínas às quais ele está ligado, sem modificar a sua sequência, podendo ser passadas às gerações seguintes (SILVEIRA *et al.*, 2007). O que se sabe até o momento é que os padrões

epigenéticos decorrentes da influência do ambiente gestacional, posteriormente transmitidos às células em desenvolvimento, consolidam e limitam as possibilidades de futuras modificações em certos genes. Nesse sentido, a programação precoce provoca alterações estruturais permanentes dos órgãos em desenvolvimento e em suas reações aos diversos estímulos (MARCINIAK *et al.*, 2017; URRUTIA-PEREIRA; SOLÉ, 2015), predispondo o indivíduo a consequências imediatamente na vida pós-natal, ou que podem permanecer silenciadas até a vida adulta (CAROLAN-OLAH; DUARTE-GARDEA; LECHUGA, 2015).

A literatura tem enfatizado a preocupação com a obesidade materna, considerando o estado inflamatório causado nos tecidos metabólicos e suas possíveis consequências fisiológicas e metabólicas nos filhos (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; CALKINS; DEVASKAR, 2011; MARCINIAK *et al.*, 2017). Sabe-se que a PE, além de ser uma doença infecciosa, também é de caráter inflamatório. A relação entre a obesidade e a PE pode ser explicada, pois o tecido adiposo produz grandes quantidades de citocinas e hormônios chamados de adipocinas, as quais podem causar a indução do processo inflamatório e o distúrbio oxidativo, gerando uma fisiopatologia similar entre as duas patologias (DESCHNER *et al.*, 2014; SLOTWINSKA; SLOTWINSKI, 2015).

Com a ocorrência de insultos no período intrauterino, como é o caso das doenças maternas citadas, que apresentam quadro inflamatório sistêmico, a epigenética das células musculares podem ser alteradas, sabendo que suas propriedades morfofuncionais são determinadas durante a embriogênese e esta é uma fase crucial do desenvolvimento muscular, pois o tecido muscular vai reagir através de adaptações, as quais podem afetar a saúde do tecido ao longo de sua vida (JUNG; CHOI, 2014).

3.2 Obesidade

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define o sobrepeso e a obesidade como o acúmulo de adiposidade que representa risco à saúde, o que é provocado principalmente pela falta de atividade física e pelo perfil alimentar (DIAS *et al.*, 2017; WHO, 2018). O resultado do desequilíbrio energético, entre as calorias consumidas e gastas, acarreta o excesso de peso corporal, cujas alterações energéticas podem ocorrer pela associação de vários fatores, como: mudanças profundas econômicas, sociais, ambientais; fatores genéticos, fisiológicos e psicológicos (HRUBY; HU, 2015; PASTORE *et al.*, 2010). Considera-se que o tecido adiposo libera citocinas e alguns mediadores bioativos que estão diretamente relacionados à inflamação, o que leva ao aumento no risco do desenvolvimento de doenças crônicas (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Na atualidade, a obesidade é considerada como uma epidemia mundial, sendo um dos problemas mais importantes de saúde global (LEOCÁDIO *et al.*, 2021). Segundo a OMS, a obesidade mundial quase triplicou desde 1975, estimando-se que em 2016 mais de 650 milhões de adultos estavam obesos e 1,9 bilhão estavam acima do peso (WHO, 2021). Já no Brasil, segundo a Pesquisa Nacional de Saúde publicada em 2019, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, mostrou-se que, ao longo de 17 anos, a prevalência de obesidade dobrou entre a população adulta brasileira, passando de 14,5% para 30,2% nas mulheres e de 9,6% para 22,8% entre os homens. Cerca de 60,3% dos adultos estão acima do peso, ou seja, cerca de 96 milhões de pessoas (26,8%) estão obesos, cuja maior prevalência é entre as mulheres (IBGE, 2020).

É preocupante a elevação desses índices em mulheres durante a gestação, pois os filhos de pais obesos são predispostos ao desenvolvimento da doença (URRUTIA-PEREIRA; SOLÉ, 2015; JANG; SERRA, 2014). A obesidade também pode ser determinada por fatores genéticos. Os autores Bayol *et al.*, (2005) mostraram que a dieta materna tem papel importante para o desenvolvimento saudável da criança, por isso a preocupação com a obesidade e a possível ocorrência da PF. Sendo assim, é necessário entender os mecanismos relacionados a essa patologia (GHAFFARI *et al.*, 2015).

Existem dois tipos principais de obesidade em modelos experimentais, desenvolvidas em animais, dependendo das alterações metabólicas presentes

(NASCIMENTO *et al.*, 2008; ORNOY, 2011; URRATIA-PEREIRA; SOLÉ, 2015). São eles: animais que são modificados geneticamente e animais que, para ser desenvolvida a doença, recebem dietas ou fármacos (NAGARAJAN *et al.*, 2012).

3.3 Obesidade hipotalâmica

A obesidade hipotalâmica (OH) em seres humanos pode ser causada por diversos fatores que provocam lesões no hipotálamo, dentre os quais podemos citar alguns mais comuns, como: alterações genéticas, terapias que visam à remoção de tumores cerebrais, incluindo também a utilização de radioterapia. As lesões causadas por esses fatores citados acarretam disfunções neuroendócrinas que levam ao desenvolvimento da obesidade (GUIMARÃES *et al.*, 2017; REYES; SAWCHENKO, 2002).

Para melhor entendimento sobre a obesidade e sua interação com os aspectos de vida dos indivíduos, estão sendo realizadas pesquisas com modelos experimentais, utilizando animais que são modificados geneticamente para desenvolver a obesidade (FERNANDEZ *et al.*, 2016; NAGARAJAN *et al.*, 2012).

O método experimental realizado com a alterações do hipotálamo é utilizado há décadas e mostra resultados importantes, principalmente em relação aos núcleos hipotalâmicos, que possuem ações bastante específicas no metabolismo energético. Sabe-se que a alteração hipotalâmica pode induzir à obesidade e essa indução pode ser feita de diferentes formas, porém a mais comum, utilizada em roedores nas pesquisas, é realizada com aplicação de MSG, que resulta em alterações no metabolismo energético e, por ser um aminoácido neuroexcitatório, causa destruição de neurônios que prejudica principalmente a sinalização de leptina e insulina (OLNEY, 1969; GUIMARÃES *et al.*, 2017; REYES; SAWCHENKO, 2002).

O desenvolvimento da obesidade já é possível observar em média com 60 dias de vida, progredindo com o tempo, sendo que os sinais mais expressivos são possíveis identificar em torno dos 90 dias de vida e são verificados através das alterações metabólicas, do aumento das taxas de triglicerídeos e colesterol e do índice de Lee (LEGUISAMO *et al.*, 2012; QUINES *et al.*, 2018).

Conforme encontrado no estudo de Bois e Huang (2007), em média o quinto dia de vida, na fase inicial do desenvolvimento, é o momento crítico para promoção de alterações neuronais, devido à barreira hematoencefálica não estar completamente desenvolvida. De encontro com essas informações, foram verificados em roedores que através de elevadas doses de MSG durante o período neonatal, ocorreram diversas alterações consecutivas das lesões neuronais e, como consequência, a intolerância à glicose, a dislipidemia, a hipersecreção de insulina, a adiposidade juntamente à resistência à insulina, a esteatose hepática (CHEN *et al.*, 2013; FRANÇA *et al.*, 2014; CALTON *et al.*, 2014).

O estudo de Pimentel *et al.*, (2013) verificou que o modelo experimental da OH induzido pelo MSG colabora para a neurotoxicidade hipotalâmica, a qual interfere na fosforilação de uma proteína quinase que se ativa pelo AMP e, em consequência, também interfere na ingestão de alimentos e no peso corporal, sendo que essa proteína está diretamente relacionada à homeostase energética e à regulação do comportamento alimentar. Diversos efeitos metabólicos foram observados, devido à neurotoxicidade, como a obesidade relacionada à resistência transitória à insulina, como também algumas alterações metabólicas do fígado, do músculo esquelético e do sangue (QUINES *et al.*, 2018). Além disso, nos estudos de Bonfleur *et al.* (2015) e Tamura *et al.* (2015), os animais apresentaram aumento no índice de Lee desde os 30 dias de vida, principalmente no teor de gordura epididimal, mesmo apresentando redução do desempenho do crescimento.

A desregulação da homeostase metabólica corporal tem origem na desregulação do eixo hipotalâmico-hipófise adrenal, o qual foi induzido através da OH por neuro-intoxicação neonatal por MSG. A influência dos efeitos dessas alterações pode ser vista em diversos tecidos e órgãos, incluindo o tecido muscular esquelético, sabendo-se que a lipotoxicidade acarretada pela OH prejudica principalmente mecanismos de síntese e degradação proteica dos músculos (STRAUB; CUTOLO; 2016; QUINES, *et al.*, 2018). A ação inflamatória crônica presente obesidade pode ser o gatilho para o desenvolvimento ou a progressão da PE (BRANDELERO *et al.*, 2012; DAHIYA *et al.*, 2012; LINDEN, *et al.*, 2007).

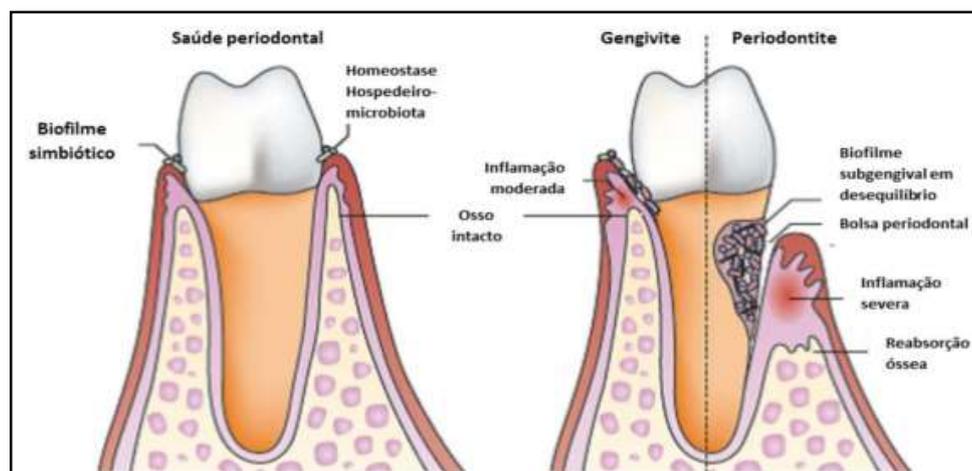
3.4 Doença periodontal

Segundo o Global Burden of Disease Study (2016), a DP ficou colocada em 11^a lugar de prevalência no mundo, variando de 20% a 50%, considerada uma das doenças bucais mais importantes. Entre os anos de 1990 e 2010, as taxas de carga global de DP aumentaram para 57,3%. O aumento da prevalência da doença já é esperado para os próximos anos, visto que haverá crescimento da população idosa, sendo que estes apresentam retenção de dentes naturais devido à diminuição na perda dentária (LISTL; GALLOWAY; MOSSEY, 2015).

O periodonto é caracterizado por uma estrutura complexa e dinâmica a qual é constituída por tecidos moles e duros que abrangem o cemento e os tecidos de auto renovação, como a mucosa gengival (epitélio e tecido conjuntivo), o osso alveolar e o ligamento periodontal. A união dessas estruturas fornece proteção e suporte para a fixação dos dentes na mandíbula e maxila (Figura 1) (GARLET *et al.*, 2012). Para essas estruturas se manterem com boa saúde periodontal clínica, é necessário controle imune e fisiológico, o que envolve níveis de marcadores biológicos e inflamatórios compatíveis com a homeostase (CHAPPLE *et al.*, 2018) a qual promove vedação do meio interno, contribuindo para manter a saúde periodontal do hospedeiro quando sofre agressões bacterianas (CARRANZA, 1983).

A DP é uma condição crônica e inflamatória que pode ser causada por placa dentária chamada de biofilme, que, quando sofre mudanças no equilíbrio entre hospedeiro e fatores bacterianos, leva ao sofrimento dos tecidos do periodonto (PETERSEN; OGAWA, 2012; HASAN; PALMER, 2014; LIRA-JUNIOR *et al.*, 2016). Os dois tipos de manifestações clínicas da DP mais encontrado, é a gengivite, uma inflamação somente nos tecidos moles, no tecido conjuntivo e no epitélio e, quando feito o tratamento, é reversível. O segundo é chamado de PE, um caso de inflamação grave que ocorre em todas as estruturas do periodonto, podendo acarretar perdas dentárias como também levar a danos irreversíveis (Figura 1) (ALBANDAR, 2002; PETERSEN; OGAWA, 2012).

Figura 1 - Imagem ilustrativa de uma comparação entre as das estruturas saudáveis e as que são lesionadas na DP.



Fonte: Adaptado de HAJISHENGALLIS (2015).

O mecanismo patogênico inflamatório responsável na PE por desencadear a perda óssea está diretamente relacionado ao recrutamento dos neutrófilos para o sulco gengival, os quais entram no tecido conjuntivo e interagem com as células imunes, após não conseguirem controlar a microbiota patogênica. As células imunes originam citocinas pró-inflamatórias reabsortivas ao osso fator de necrose tumoral e Interleucina 1-beta, que colabora e intensifica a resposta inflamatória (OTOMOCORDEL *et al.*, 2012; HAJISHENGALLIS, 2015).

As alterações no periodonto se desenvolvem com o acúmulo dos micro-organismos na placa bacteriana localizada na margem gengival e são a partir destas alterações que se torna possível a colonização das bactérias gram-negativas. A interação dos componentes bacterianos gram-negativos, como os lipopolissacarídeos com os receptores superficiais dos queratinócitos do epitélio sulcular, atinge diretamente o tecido conjuntivo. Esse distúrbio é considerado clinicamente como fase inicial, restringindo os tecidos de proteção, apresentando sinais de vermelhidão e inchaço na gengiva, sangramento provocado, alteração na estruturação da gengiva como também elevação no fluxo do fluido da gengiva, representando a gengivite (RODINI, 2005). Quando a resposta imunológica do hospedeiro não for suficiente para controlar a inflamação e o indivíduo não apresentar boa higiene oral, como também o tratamento adequado, a gengivite pode acarretar o desenvolvimento da PE (LINDHE; LANG, 2015).

Além do grande impacto na cavidade oral que causa esta patologia, as bactérias, inflamações e infecções são fatores de risco para o desenvolvimento de diversas doenças. As principais que podemos destacar, são doenças sistêmicas, obesidade, diabetes, parto prematuro, baixo peso ao nascimento, acidente vascular cerebral, artrite reumatoide, entre outros (COLOMBO *et al.*, 2015; OTOMO-CORGEL *et al.*, 2012).

O estudo da PE em humanos apresenta limitações, pela possibilidade de ocorrer variações de gravidade da lesão de dente para dente, no próprio indivíduo ou até mesmo entre os indivíduos. Assim, estudos em animais são amplamente utilizados para avaliar a patogênese e as modalidades terapêuticas da periodontite (LINDHE; LANG; LARRING, 2010; LISTGARTEN, 1975). Este estudo experimental se tornou válido pois os ratos apresentam semelhança anatômica da região molar com o homem (CHANG *et al.*, 2002).

A indução da PE pode ser feita de diversas formas, como por meio da manipulação dietética, da inoculação experimental de microrganismos patogênicos ou de seus produtos (FIEHN; KLAUSEN; EVANS, 1992; KLAUSEN, 1991; SALLAY *et al.*, 1984), ou através da ligadura localizadas na região cervical dos molares de ratos, utilizando um fio de nylon ou algodão, geralmente colocado no primeiro molar superior ou inferior. É um método amplamente utilizado devido à relativa facilidade no método e possui baixo custo (FOUREAUX *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2012).

A constatação da doença pode ser feita através da verificação da ocorrência de sangramento gengival, da presença de inflamação contendo linfócitos T e B, macrófagos, destruição das fibras colágenas e hiperatividade osteoclástica. Visto que os efeitos desses métodos são muito semelhantes aos analisados em humanos (BEZERRA *et al.*, 2000; GRAVES *et al.*, 2011; HENNEMAN *et al.*, 2012), a PE pode também ser constatada no roedor através da análise radiográfica, fazendo a medida da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo do rato (NASSAR *et al.* 2009).

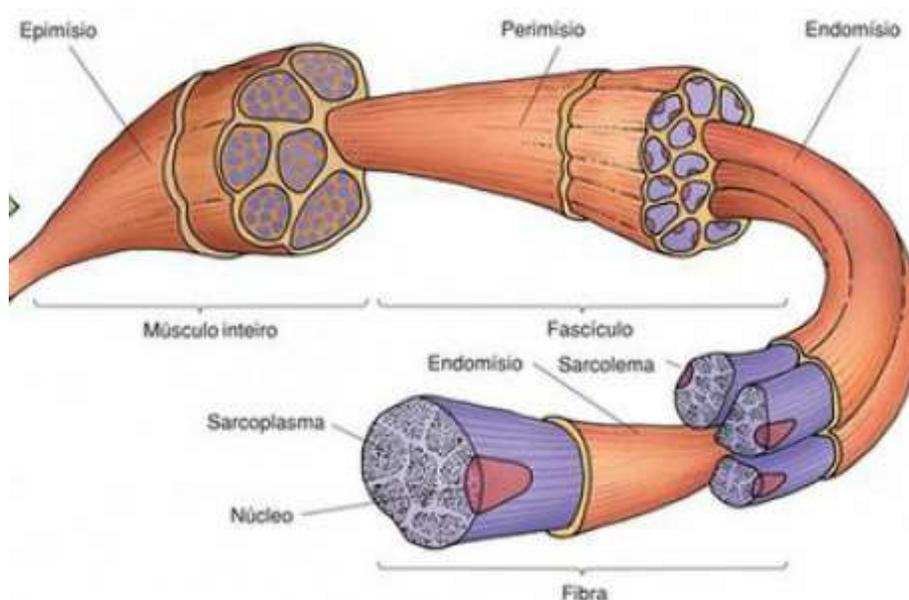
Após definir a forma de indução da doença, podem ser realizados estudos que abrangem sua patogênese, seu desenvolvimento, bem como o tratamento. Sendo assim, os pesquisadores vêm investigando a combinação causal da PE com outras doenças, como a obesidade (BERTOLINI *et al.*, 2010; BRANDELERO *et al.*, 2011; CRAIG *et al.* 2012, COLOMBO *et al.*, 2015).

3.5 Músculo estriado esquelético e JNMs

O músculo estriado esquelético forma o maior tecido do corpo dos vertebrados, - cerca de 40 a 50% - e possui diversas funções que auxiliam no funcionamento do corpo humano. A principal função mecânica é transformar energia química em energia mecânica, gerando potência e força, estabilizando a postura e sendo capaz de produzir movimentos influenciando as atividades diárias que melhoram a saúde e geram uma independência funcional. As funções metabólicas englobam o armazenamento de substratos como os aminoácidos e carboidratos, que contribuem para o metabolismo energético e para a produção de calor, mantendo a temperatura central e o consumo de oxigênio, gerando fonte de energia para realização de exercícios físicos (FRONTERA; OCHALA, 2015; SILVA, CARVALHO, 2007).

O músculo estriado esquelético é formado por células com capacidade contrátil e por tecido conjuntivo, nervos e vasos sanguíneos. Esses tecidos são considerados menores em termos de massa relativa, mas influenciam na função do músculo. Suas células, denominadas de fibras musculares, são estruturadas em feixes recobertos por tecido conjuntivo que os mantém unidos recobrendo todo o músculo, sendo chamado de epimísio. O perimísio é o septo que envolve e separa os feixes de fibras que saem do epimísio. A lâmina basal forma outra camada composta de tecido conjuntivo e endomísio, que envolve cada fibra muscular (Figura 2). O tecido conjuntivo que compõe o músculo é frouxo e é composto por vasos sanguíneos que, através dos septos, penetram no músculo e formam uma enorme rede de capilares, que percorrem o eixo longitudinal da fibra, como também por outras estruturas, como elastina, colágeno, fibroblastos e macrófagos (GILLIES; LIEBERT, 2011; TROTTER; PURSLOW, 1992).

Figura 2 - Esquema demonstrando os componentes da célula do músculo estriado esquelético.



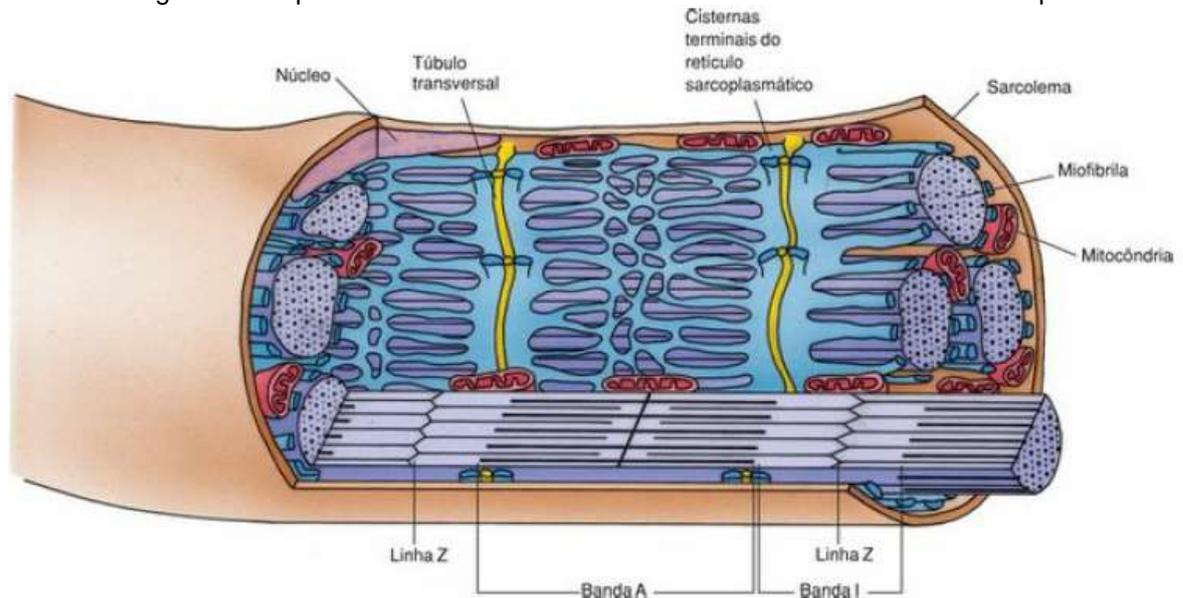
Fonte: Adaptado GARTNER; H. (2007).

Com relação às fibras musculares estriadas esqueléticas, essas são células longas, cilíndricas, e multinucleadas, sendo que seus núcleos se apresentam na região da periferia da fibra, próximos ao sarcolema (BERCHTOLD; BRINKMEIER; MUNTENER, 2000; SILVA; CARVALHO, 2007). O diâmetro dessas fibras chega a variar de 10 a 100 μm , seu comprimento depende da arquitetura do músculo, podendo chegar a 10 cm. As fibras são originadas a partir da fusão de células alongadas que são denominadas mioblastos (BERCHTOLD; BRINKMEIER; MUNTENER, 2000; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As fibras musculares esqueléticas, quando estudadas no microscópio, mostram uma característica de estriações transversais, chamadas de miofibrilas, compostas por milhares de sarcômeros com características bandas A, I, H e disco Z. Podem ser vistas através de faixas claras e escuras, sendo que a faixa escura recebe a denominação de banda A (anisotrópicas à luz polarizada) enquanto a faixa clara é chamada de banda I (isotrópicas à luz polarizada). É possível visualizar no centro da banda I uma linha na transversal escura que é chamada de disco Z. Ainda na banda A, pode-se notar uma zona mais clara localizada no centro denominada de banda H (Figura 3). Os sarcômeros medem em torno de 2,5 μm e são formados pela parte da miofibrila localizada entre dois discos Z (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA;

CARNEIRO, 2013).

Figura 3 - Esquema demonstrando as características das fibras ao microscópio de luz



Fonte: GARTNER; H. (2007)

As miofibrilas medem aproximadamente de 1 a 2 μm , são formadas por miofilamentos espessos e delgados, sendo os filamentos delgados, de actina; e os espessos, de miosina, com a posição longitudinal e a distribuição simétrica e paralelas. Os miofilamentos de actina se localizam do disco Z até a banda H e os de miosina se localiza no centro do sarcômeros (GUYTON, 2017).

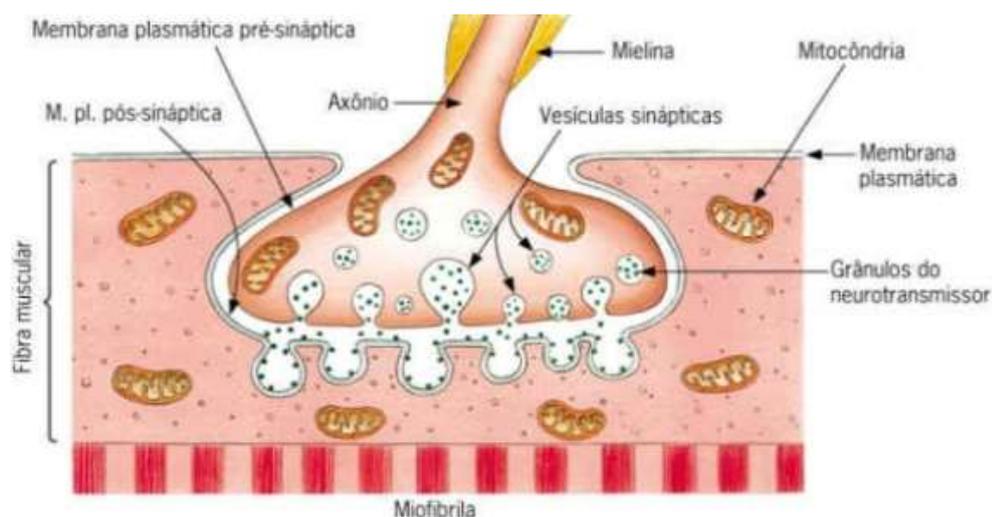
A classificação das fibras musculares é feita de acordo com a atividade da adenosinatrifosfato (ATP) miofibrilar e apresentam diferentes características morfológicas e funcionais. Fibras do tipo I são consideradas de contração lenta, apresentam metabolismo oxidativo e baixa capacidade de hidrolisar ATP; as fibras do tipo II são subdivididas em IIA, IIB e IIC. As fibras do tipo IIB são fibras de contração rápida, apresentando um metabolismo glicolítico; já as demais apresentam metabolismo intermediário. Essas fibras do tipo II, apresentam maior disposição a agravos, principalmente nutricionais, como é o exemplo do ELD (WARD; STICKLAND, 1991).

Para que ocorra a contração muscular, é necessária a formação de uma unidade motora, a qual consiste na união das células musculares estriadas esqueléticas e o neurônio motor que as inerva. É necessário que seja enviado um estímulo proveniente do sistema nervoso ao músculo esquelético, para se realizar o

movimento de contração. Quando esse estímulo atinge o potencial de ação, ele é levado ao músculo através da estrutura denominada de junção neuromuscular (JNM), que está localizada entre o neurônio motor e a fibra muscular, na região sináptica (GUYTON, 2017; WU; XIONG; MEI, 2010).

A estruturação da JNM é composta pela membrana pré-sináptica, fenda sináptica e membrana pós sináptica (Figura 4). A membrana pré-sináptica faz parte do neurônio motor, e seu corpo se localiza na medula espinal, projetando-se pelos axônios para promover a inervação das fibras musculares, agindo na síntese, no armazenamento e na liberação do neurotransmissor, o acetilcolina (ACh). Já a fenda sináptica é a matriz extracelular que estrutura e facilita a transmissão entre as membranas sinápticas. A membrana muscular pós sináptica contém os receptores de ACh e também outras moléculas que são importantes no estabelecimento da JNM (GARTNER; HIATT 2007; LENT, 2010).

Figura 4 - Demonstração da estrutura de uma junção neuromuscular.



Fonte: Adaptado de <https://auladefisiologia.wordpress.com/2009/08/20/sistema-muscular/> (Acesso em 10 set. 2021).

As enzimas conhecidas como colinesterases (ChE) são a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase. As acetilcolinesterases são abundantes no músculo e responsáveis pela degradação do neurotransmissor ACh nas fendas sinápticas. As butirilcolinesterases são encontradas em abundância em órgãos, mas também desempenham um papel secundário na hidrólise deste neurotransmissor (DAVE; SYAL; KATYARE, 2000), estas enzimas controlam as contrações musculares. A

inativação das acetilcolinesterase pode causar redução da mobilidade ou paralisia muscular (MONTEIRO *et al.*, 2005).

3.6 Efeitos da obesidade e periodontite no músculo estriado esquelético

Pesquisas estão sendo realizadas utilizando modelos de animais experimentais, para verificar os efeitos sistêmicos da obesidade e da PE (NASSAR *et al.*, 2009; OLNEY, 1969). Entretanto poucos são os estudos que analisaram os efeitos dessas doenças no músculo estriado esquelético.

A integridade do tecido muscular possui relação direta com a saúde do indivíduo (SILVENNOINEM *et al.*, 2013). Entretanto, o efeito de algumas doenças de ações hormonal e neurológicas pode provocar alterações nas características estruturais e funcionais das fibras musculares, as quais representam o fenótipo da musculatura (FRONTERA; OCHALA, 2015). Fatores como a desnutrição e a obesidade podem também promover modificações nas fibras musculares, nas suas características morfológicas, metabólicas e contráteis (ALVES *et al.*, 2008; KELLEY; GOODPASTER, 2001).

O excesso de tecido adiposo intramuscular provoca a liberação dos mediadores pró-inflamatórios que atuam na inflamação local, e quando associado com fatores mecânicos, provocam injúrias musculares, como dor e fraqueza muscular, interferindo na qualidade de vida dos indivíduos (EL-KHANI *et al.*, 2014). A contração muscular pode sofrer prejuízos, devido ao acúmulo de lipídios intramiocelulares que alteram a sinalização de insulina e prejudicam a captação da glicose (KEMP *et al.*, 2009, SILVEIRA *et al.*, 2007).

Estudos mostraram que obesidade possui relação direta com a PE (ABELLA *et al.*, 2017; AL-ZAHRANI *et al.*, 2003; SALES-PERES *et al.*, 2019; SUVAN *et al.*, 2015; LINDEN *et al.*, 2007). Neste sentido, é importante entender o processo inflamatório que ocorre no tecido muscular, ativando mediadores químicos em resposta a alterações, podendo causar prejuízo. Primeiro ocorre uma dilatação dos vasos na microcirculação, ampliando a permeabilidade vascular e o fluxo sanguíneo, levando ao extravasamento do fluido plasmático, ocorrendo o edema. Posteriormente, em resposta ao trauma, com a finalidade de levar a homeostasia para o reparo tecidual,

ocorre a resposta sistêmica, ou fase aguda. A ativação da inflamação no local pode ser apresentada pelo organismo em algumas horas após o trauma, seguida de alterações sistêmicas e fisiológicas (BECHARA; SZABÓ, 2006).

Poucas pesquisas de PE foram encontradas no músculo estriado esquelético. O músculo sóleo de ratos *Wistar* induzidos a PE, através da ligadura durante 30 dias, apresentou redução da força muscular e aumento do tecido conjuntivo (LEITE *et al.*, 2017). Os efeitos da PE por ligadura no músculo sóleo de ratos *Wistar* durante 30 dias, mostraram redução da porcentagem de tecido conjuntivo (BRANDÃO *et al.*, 2017).

Em relação aos efeitos da obesidade no músculo, foi analisada a morfologia e morfometria das fibras musculares e das JNMs do músculo ELD, da prole de ratas *Wistar* obesas, por dieta de cafeteria durante 17 semanas, com a qual se verificou aumento do peso corpóreo, relação capilar/fibra e gorduras retroperitoneal e periepididimal. O estudo mostrou redução do número de núcleos, estimativa de tecido conjuntivo, área e diâmetro maior das JNMs (KUHN *et al.*, 2021).

Após a exposição de camundongos à dieta hiperlipídica durante 8 semanas, foi observado redução do número de fibras e no número de núcleos das fibras musculares no músculo gastrocnêmio (MARINHO *et al.*, 2015). Em ratos *Wistar* submetidos à dieta de cafeteria durante 9 semanas, o músculo gastrocnêmio apresentou atrofia muscular, redução na área de secção transversal e apoptose das fibras musculares (SISHI *et al.*, 2010). Segundo os autores Bayol *et al.*, (2005), no tecido muscular estriado esquelético, da prole de ratas de mães obesas por dieta de cafeteria, foi observado na prole, com 21 dias de vida, redução significativa no número de fibras musculares, na área de secção transversal e no número de núcleos.

O quadro inflamatório sistêmico similar apresentado na obesidade e PE é preocupante, podendo afetar diretamente a saúde do músculo estriado esquelético, causando alterações morfológicas e morfométricas no tecido, as quais podem prejudicar a função muscular. Portanto, essa pesquisa é importante para fornecer resultados sobre a PF e seus efeitos pela obesidade e a PE no músculo ELD, em modelo experimental com ratos *Wistar*.

ARTIGO CIENTÍFICO

**THE INFLUENCE OF FETAL PROGRAMMING DUE TO MATERNAL
OBESITY AND PERIODONTITIS ON THE EXTENSOR DIGITORUM LONGUS
MUSCLE OF WISTAR RATS**

REVISTA: INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY

NORMAS DA REVISTA: ANEXO B

**The influence of fetal programming due to maternal obesity and periodontitis on the
extensor digitorum longus muscle of Wistar rats**

Gabriella Lopes Cappellaro¹, Thayná Náthally Petry de Paula¹, Mikael Gerson Kuhn¹,
Rafaella Cristina Lima da Silva², Carlos Augusto Nassar¹, Rose Meire Costa Brancalhão¹,
Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro¹, Sandra Lucinei Balbo¹, Ana Tereza Bittencourt
Guimarães¹, Marcia Miranda Torrejais¹

¹ Programa de Pós Graduação em Biociências e Saúde – UNIOESTE, Cascavel – PR, Brasil.

² Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado - UNIOESTE, Cascavel – PR, Brasil.

Correspondência

Gabriella Lopes Cappellaro
Endereço da instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Rua Universitária, 2069, bloco de Ciências, sala 95 – Jardim Universitário
Cascavel, PR – Brasil. CEP 85819-110
Telefones: (45)3220-3132
E-mail do autor: gabycappellaro@hotmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the effects of fetal programming due to maternal obesity and/or periodontitis (PD) on the morphology and morphometry of the extensor digitorum longus (EDL) muscle in adult offspring of Wistar rats. Twenty pregnant Wistar rats were used for formation of the parental generation: one group was injected with monosodium glutamate to induce obesity (MSG, n=30), while the control group received hyperosmotic saline (CTL, n=30). After 70 days, 15 animals of each group were submitted to the induction of PD by ligation. The animals were reassigned to four groups and crossed to form the F1 generation (n=7/group). The offspring of dams with PD were again subjected to PD induction by ligation at 90 days of age. At 120 days, the animals were euthanized and the EDL muscle was collected and weighed for histological study. The MSG/PD-F1 group showed a reduction in body weight compared to the PD-F1 group, as well as in retroperitoneal and periepididymal fat and EDL length compared to the MSG-F1 and PD-F1 groups. The muscle fibers had central nuclei and an amorphous shape, with differential staining in the groups with the diseases. There were significant differences in fiber density and capillary/fiber ratio between the PD-F1 and CTL-F1 groups. An increase in connective tissue was observed in the MSG-F1 group compared to CTL-F1 and in the MSG/ PD-F1 group compared to PD-F1. In conclusion, fetal programming due to maternal obesity and PD may affect body development and muscle function of the offspring.

Keywords: Fetal development; periodontal disease; monosodium glutamate, skeletal muscle

INTRODUCTION

Fetal programming refers to permanent or long-term changes in an organism as a result of stimuli or insults that occur during a certain critical period of life (1) such as the pre- and postnatal periods (childhood to adolescence), which are characterized by a high degree of plasticity (2). Fetal programming can be caused by different insults, including maternal and fetal diseases, nutritional alterations, medical interventions, smoking, and hypertension (3, 4). These disturbances modify the development of the fetus through the so-called epigenetic mechanisms, which are molecular alterations that occur in DNA or in related proteins (2). These alterations have consequences for the following generations, immediately during postnatal life or remaining silent through to adult life (5).

Studies on fetal programming have provided important data regarding the origin of diseases that manifest in adults. Maternal nutrition is one of the factors that has attracted widespread attention, considering the increase in the global incidence of obesity (6). According to the World Health Organization (7), approximately 2.3 billion people worldwide are overweight or obese. In Brazil, about 96 million people are overweight (8).

Obesity is a key factor in the development of metabolic syndrome (9). Furthermore, obesity is related to low-grade chronic systemic inflammation in adipose tissue, which is caused by activation of the immune system and triggers a proinflammatory state and local and systemic oxidative stress. This inflammatory condition is associated with the development of chronic diseases such as diabetes mellitus, cardiovascular and liver diseases, and periodontal diseases (10-12).

It is therefore important to study how the inflammatory condition in obesity is related to other diseases. One of such diseases is periodontal disease, which affects a large proportion of the population. Periodontal disease ranks 11th position in global prevalence, ranging from

20% to 50%, and is considered one of the most important oral diseases (13). It is an inflammatory and infectious disease that affects the supporting structures of the teeth. The most severe form is periodontitis (PD) (14).

Studies have shown that obesity contributes to the severity of PD (15, 16). The relationship between obesity and PD can be explained by the increase in the plasma concentration of proinflammatory cytokines. The release of cytokines by adipose tissue and by proinflammatory hormones can induce inflammatory processes and oxidative stress, which result in a similar pathophysiology of the two diseases (17). However, the biological mechanism underlying this relationship is not fully understood and there is a lack of studies aimed at elucidating the effects of these systemic inflammatory diseases on muscle tissue integrity.

Skeletal muscle possesses adaptive capacity and plasticity that permit it to respond to stimuli or insults such as hormonal changes and maternal diseases that can affect muscle health (18, 19). Compound muscles with a predominance of type II fibers show a predisposition to nutritional disorders. The extensor digitorum longus (EDL) muscle (20) is such a muscle and was used in the present study.

Therefore, this study aimed to analyze the effects of fetal programming due to maternal obesity and/or PD on the morphology and morphometry of the EDL muscle in adult offspring of female Wistar rats.

METHODS

This experimental, quantitative, randomized study was conducted at the Laboratory for the Study of Injuries and Physiotherapeutic Resources (LELRF) and at the Experimental Laboratory of Morphology (LABEM), State University of Western Paraná (UNIOESTE), Cascavel Campus. The local Ethics Committee approved all procedures involving animals on 8 February 2017.

Animals

For this study, pregnant Wistar rats (n=20) were maintained under controlled conditions of temperature ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and light (12-hour light/dark cycle, 7:00-19:00 h). The animals received water and standard chow throughout the experiment and were weighed once a week after weaning.

Characterization of groups and experimental design of dams

After the birth of the pups of the parental generation, only female rats were used for disease induction (obesity and PD), while male rats were separated for subsequent crossing. The female rats were divided into two groups: during the first 5 days of life, one group received subcutaneous injections of monosodium glutamate to induce obesity (MSG group, n=30) and the control group received hypertonic saline solution (CTL group, n=30) (21). At 70 days of age, the female rats were divided into four groups of 15 animals each; in two groups, the animals were submitted to the induction of PD by ligature (22), corresponding to the parental generation (n=60): control (CTL, n=15), periodontitis (PD, n=15), MSG-induced obesity (MSG, n=15), and MSG-induced obesity + periodontitis (MSG/PD, n=15). At 77 days of age, i.e., 7 days after PD induction, five females per group were euthanized for the confirmation of PD by

radiographic analysis and of obesity based on the Lee index and periepididymal and retroperitoneal fat weights. After confirmation, the females of all groups were crossed with the control rats at a ratio of one male to two females.

Pregnancy was confirmed by weighing and monitoring of the estrous cycle. After confirmation, the male rats were euthanized. The gestation and lactation period lasted 45 days and the dams were euthanized thereafter. Only male offspring composed the F1 generation and were divided into the following groups: control (CTL-F1), periodontitis (PD-F1), MSG-induced obesity (MSG-F1), and MSG-induced obesity + periodontitis (MSG/PD-F1). The PD-F1 and MSG/PD-F1 groups were submitted to the induction of PD by ligature at 90 days of age and were euthanized at 120 days (22). Obesity was not induced in the offspring groups.

Protocol for the induction and confirmation of obesity

During the first 5 days of life, animals of the parental generation were submitted to the protocol of obesity induction, which consisted of daily subcutaneous injections of 4 g MSG/kg in the neck region (MSG group, n=30). Control animals received hypertonic saline solution (1.25g/kg/day; CTL group, n=30) (21).

Before euthanasia, obesity was confirmed by the measurement of body weight and nasoanal length for calculation of the Lee index $\{[\text{body weight (g)/nasoanal length (cm)}] \times 1,000\}$ (23, 24). After euthanasia, the retroperitoneal and periepididymal fat was collected and weighed on a digital scale. Relative fat accumulation was estimated by dividing these values by 100 g of body weight (g/100 g) (23). The fat weights were summed for statistical analysis.

Protocol for the induction and confirmation of periodontitis

For PD induction, the animals were anesthetized by intraperitoneal injection of 0.08 mg/kg ketamine hydrochloride (Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio, Paulínia, SP) and 0.04

mg/kg xylazine hydrochloride (Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio, Paulínia, SP). The animals were then positioned on an operating table, with the mouth being kept open to facilitate access to the teeth in the posterior mandible. Using modified tweezers and an exploratory probe, cotton thread number 40 (GLACE®) was placed around the right and left mandibular first molars. Ligature favors the accumulation of bacterial plaque, which is a gingival irritant (22). After the PD protocol, the animals were divided into four groups: control (CTL group), MSG-induced obesity (MSG group), periodontitis (PD group), and MSG-induced obesity + periodontitis (MSG/PD group). The disease was confirmed 7 days after induction and five females each in the PD and MSG/PD groups were euthanized. Offspring of the PD-F1 and MSG/PD-F1 groups were submitted to the PD protocol at 90 days of age; 30 days later, these animals were euthanized and disease was confirmed by radiographic analysis.

After euthanasia, the left hemimandibles of each animal (dams and offspring) were removed and fixed in 10% formaldehyde for 48 hours. Next, the samples were washed under running water for 24 hours and kept in 70% alcohol. The hemimandibles were placed with the lingual side on a Kodak RVG 6100 digital radiographic sensor [image resolution of 20 lp/mm, theoretical resolution of sensor of 27.03 lp/mm, optical fiber 1, active surface dimensions of 22 x 30 mm, and matrix dimensions (pixels) of 1,200 x 1,600 (1.92 million)] and then positioned in such a way that the buccal and lingual cusps of the first molars were in the same vertical plane. A GE 1000 X-ray machine (15 mA, 65 Vp, 18 impulses, focus/film distance of 50 cm) was used, with the X-ray beam perpendicular to the specimens. From the digitized images, three linear measurements (in pixels) of the distance from the cemento-enamel junction to the alveolar bone crest were obtained on the mesial side of the left mandibular first molar using the Image Pro Plus® program (Media Cybernetics, Maryland, USA) and the mean of these measurements was calculated (Figure 1) (22). All measurements were made by a single examiner blinded to the identity of the experimental groups.

Collection of EDL muscle

For collection of the EDL muscle, the skin of the pelvic limbs was separated and the tibialis anterior muscle was removed for dissection of the EDL muscle. The length (mm) of the muscle was measured with a digital caliper (Digimess®, São Paulo, Brazil) and the muscle was weighed on a digital scale. The EDL muscle was then cut into fragments and the right antimere was fixed in Methacarn for 24 hours and stored in 70% alcohol until the time of processing for histological analysis of muscle fibers and connective tissue. The left antimere was fixed in Karnovsky fixative (26) for the histochemical study of neuromuscular junctions (NMJs).

Histological study of muscle fibers and connective tissue

The EDL muscle was embedded in histological paraffin using the N-butyl alcohol protocol. The specimens were then cut transversely into 7- μ m-thick semi-serial sections using a Leipzig microtome. The sections obtained were processed as described below.

For the study of muscle fibers, the sections were stained with hematoxylin-eosin (27). These slides were used for the quantification of nuclei and measurement of fiber area, major and minor muscle fiber diameters, nucleus/fiber ratio, and capillary/fiber ratio based on the analysis of 15 microscopic fields (40x objective) per animal. Only intact fibers in the microscopic fields were considered for the measurement of fiber area and nucleus quantification. For determination of the capillary/fiber ratio, muscle fibers covering the upper right margins were included in the count, while muscle fibers present in the lower left margins were excluded from the analysis. Two trained evaluators individually performed the quantification using the mean of the values obtained (28).

For the study of connective tissue, the sections were stained with Masson's trichrome (29) and the percentage of connective tissue was determined in 10 microscopic fields per animal (40x objective).

Morphological and morphometric study of neuromuscular junctions

For the study of NMJs, fragments of the left antimeres of the EDL muscle fixed in Karnovsky solution were cut into three or four longitudinal sections with stainless-steel blades. The sections obtained were submitted to the nonspecific esterase reaction (30). For morphometric analysis of NMJs, the area and major and minor diameters of 100 NMJs per animal were measured on the microscopic images (20x objective).

Analysis of cholinesterase activity

The EDL muscle was frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -80°C . The samples were homogenized in 1 mL Tris-HCl buffer, pH 7.4, and centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes at 4°C . Protein was quantified in the samples by the method of Bradford et al. (31) using bovine serum albumin as standard. All samples were then normalized to 1 mg protein/mL.

The neurotoxic effect of diseases was assessed by measuring the activity of cholinesterase (ChE) using the method of Ellman (32), adapted for microplates by Herbert (33). Acetylcholine was used as substrate and 5,5'-diethyl-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as color reagent. Absorbance was read in a spectrophotometer at a wavelength of 405 nm, with four readings over 3 minutes. Enzyme activity was expressed as nmol hydrolyzed acetylthiocholine $\text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$.

Image analysis

For the morphometric study of muscle fibers, connective tissue and NMJs, the images were captured with an Olympus DP71 camera (Tokyo, Japan) coupled to an Olympus Bx60® microscope using the DP Controller 3.2.1 276 program. Morphometric analysis was performed using the Image Pro Plus 6.0® program (Media Cybernetics, Maryland, USA).

Statistical analysis

The results were analyzed statistically using the XLSTAT 2014.5.03 software by Addinsolt. The normality distribution of all variables was tested. Data showing a normal distribution were compared by two-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparisons post-test. The Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test, was used for non-normally distributed data. The results were expressed as the mean \pm standard deviation. A p value <0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Study of dams

Body parameters

Animals of the MSG group exhibited a reduction of 18% ($p<0.0001$) in body weight and of 11% ($p<0.0001$) in nasoanal length compared to the CTL group. There was an increase of 106% ($p<0.0001$) in retroperitoneal and periepididymal fat weights in the MSG group compared to the CTL group. Comparison of the MSG-PD and PD groups showed a reduction of 22% ($p<0.0001$) in body weight and of 8% ($p<0.0001$) in nasoanal length in the former. The MSG-PD group exhibited a 53% increase ($p<0.0001$) in retroperitoneal and periepididymal fat weights when compared to the PD group (Table 1).

Radiographic analysis

Radiographic analysis of the hemimandibles revealed greater alveolar bone loss in the groups submitted to PD induction (PD and MSG/PD groups) compared to the CTL and MSG groups; however, obesity did not exacerbate bone loss in the MSG-PD group. Bone loss was

61% higher ($p < 0.0001$) in the PD group compared to the CTL group, but 24% ($p < 0.0317$) lower in the MSG/PD group compared to the PD group (Figure 2).

Study of offspring

Macroscopic parameters

Animals of the MSG/PD-F1 group exhibited a 9% reduction ($p < 0.0248$) in body weight compared to the PD-F1 group. Retroperitoneal and periepididymal fat weights were reduced by 18% ($p < 0.0001$) in the MSG/PD-F1 group compared to the MSG-F1 group and by 31% ($p < 0.0001$) compared to the PD-F1. Regarding EDL muscle length, there was a reduction of 23% ($p < 0.0089$) in the MSG/PD-F1 group compared to the MSG-F1 group and of 21% ($p < 0.0089$) compared to the PD-F1 group. However, no significant differences in nasoanal length, Lee index or EDL muscle weight were observed between the groups studied (Table 2).

Radiographic analysis

Bone loss was 49% higher ($p < 0.0004$) in the PD-F1 group compared to the CTL group confirming the onset of the disease. A 35% higher bone loss was observed in the MSG/PD-F1 group compared to the MSG-F1 group. There was no significant difference between the other groups (Figure 3).

Morphological and morphometric analysis of muscle fibers

Morphological analysis of the EDL muscle showed preserved fiber morphology in the CTL group, including maintenance of the polygonal shape, fascicular arrangement and multinucleated cells with peripheral nuclei (Figure 4A).

Some muscle fibers with central nuclei were observed in the MSG-F1, PD-F1, and MSG/PD-F1 groups (Figure 4B, 4E, and 4G). The fibers had an amorphous shape and the sarcoplasm was differentially stained, which was more expressive in the MSG/PD-F1 group (Figures 4C, 4D, 4F, 4H, and 3I). Fibroblasts were observed in the connective tissue of all groups studied (CTL-F1, MSG-F1, PD-F1, and MSG/PD-F)1 (Figure 5E, 5F, 5G, and 5H).

Morphometric analysis of EDL muscle fibers showed a 17% reduction ($p < 0.0775$) in fiber density in the PD-F1 group compared to the CTL-F1 group. The capillary/fiber ratio was increased by 38% ($p < 0.0697$) in the PD-F1 group compared to the CTL-F1 group. However, there were no significant differences between the four groups studied in terms of muscle fiber area, major and minor diameter, peripheral and central nuclei, nucleus/fiber ratio, total number of capillaries, or capillary/fiber ratio (Table 3).

Analysis of connective tissue

Connective tissue was detected in the perimysium and endomysium of the four groups (Figure 5A, 5B, 5C, and 5D), with a predominance in the perimysium of the MSG-F1 and MSG/PD-F1 groups (Figure 5B and 5D). The results of connective tissue estimation showed a significant increase of 51% ($p < 0.0001$) in the MSG-F1 group when compared to the CTL-F1 group. Animals of the MSG/PD-F1 group exhibited an increase of 25% ($p < 0.0301$) compared to the PD-F1 group. There was no significant difference between the PD-F1 and CTL-F1 groups or between the MSG/PD-F1 and MSG-F1 groups (Table 3).

Morphologic and morphometric analysis of NMJs in EDL muscle

The animals of all groups studied exhibited NMJs with elliptical, oval, and round shapes (Figure 6A, 6B, 6C, and 6D) and no changes in morphology were observed. Morphometric

analysis revealed no significant differences in the area or major or minor diameter of the NMJs between the groups studied (Table 4).

Analysis of cholinesterase activity

There were no significant differences in ChE enzymatic activity between the groups studied ($p>0.05$) (Table 4).

DISCUSSION

The present study demonstrated a reduction of 18% in body weight and of 11% in nasoanal length in dams submitted to obesity induction (MSG group) compared to the CTL group. In contrast, the group of dams submitted to the induction of obesity and PD (MSG/PD group) exhibited a reduction of 22% in body weight and of 8% in nasoanal length compared to the PD group. These findings can be explained by the neurotoxic effect of MSG, which causes lesions in the hypothalamus that can reduce the production of growth hormone-releasing hormone, with a consequent decrease in the circulating levels of growth hormone. The latter is responsible for the growth of body tissues and its reduced secretion can result in stunted growth and shorter body length and lower body weight and muscle mass (21, 34, 35). The results of this study agree with the literature. For example, Mattia et al. (36), who evaluated the effect of MSG and ligature-induced PD on periodontal tissues of Wistar rats, observed body weight loss in animals of the obese and obese with PD groups.

An increase in retroperitoneal and periepididymal fat weights was observed in the MSG group compared to the CTL group and in the MSG/PD group compared to the PD group, confirming obesity. These results corroborate the findings of Coradini et al. (37) who observed an increase in both types of fats in Wistar rats with MSG-induced obesity. This finding can be

explained by the fact that the hypothalamus is the organ that regulates food intake and energy expenditure. Lesions in this region caused by excess MSG can cause dysfunction of the hypothalamic-pituitary axis and one consequence of this dysfunction is excessive fat accumulation (38, 39).

Radiographic analysis of maternal alveolar bone loss revealed greater bone resorption in the groups submitted to PD induction compared to the other groups, confirming the onset of the disease. However, bone loss was 24% lower in the MSG-PD group when compared to the PD group, suggesting that MSG-induced obesity exerts a protective effect on alveolar bone loss. The present results corroborate the findings of other studies (10, 36, 40). The protective effect of obesity on bone tissue can be explained by the higher concentration of insulin in obese individuals since osteoblasts possess an insulin receptor that stimulates osteogenic differentiation and inhibits osteoclastogenesis (41, 42).

Numerous studies have sought to understand the effect of maternal alterations such as obesity and PD on the offspring (43-46). However, few studies have investigated the association between the two variables and their effects on skeletal muscle. In the present study, analysis of macroscopic parameters of the offspring revealed no significant difference in nasoanal length, Lee index, or EDL muscle weight between the groups studied. However, the MSG/PD-F1 group exhibited a 9% reduction in body weight when compared to the PD-F1 group. Retroperitoneal and periepididymal fat weights were reduced by 18% in the MSG/PD-F1 group compared to the MSG-F1 group and by 31% compared to the PD-F1 group. Animals of the MSG/PD-F1 group also exhibited a reduction of 23% in EDL muscle length compared to the MSG-F1 group and of 21% compared to the PD-F1 group. The results suggest that obesity did not develop in the offspring over the period of the experiment. Studies using the same experimental model of maternal obesity have shown that the offspring start to develop obesity by 5 months of life (approximately 150 days) (47, 48), while the offspring in this study were euthanized at 120 days

of life (approximately 4 months). However, the alteration in muscle length suggests that the association of systemic inflammatory diseases can lead to muscle changes.

Fetal programming suggests that the occurrence of insults during perinatal life (first “hit”) would not be sufficient to modify the adult phenotype. However, exposure to stressors during postnatal life would act as a second “hit” and could unmask or potentiate the effects of fetal programming (49, 50). In the present study, the offspring of dams with induced PD were also submitted to induction of the diseases. Bone loss was 49% higher in animals of the PD-F1 group when compared to the CTL-F1 group, demonstrating the onset of the disease. The 35% higher bone loss in animals of the MSG/PD-F1 group compared to the MSG-F1 group also confirmed the onset of the disease; however, obesity did not exacerbate this bone loss.

Muscle tissue is characterized by high plasticity and some stimuli can trigger morphological, functional, and metabolic changes. Thus, phenotypic adaptation of the muscle can occur in different situations, such as nutritional alterations, resistance exercise, electrical stimulation, aging, and heat stress (51). In the present study, morphological analysis of the muscle fibers revealed point alterations such as amorphous fibers with differentially stained sarcoplasm in the groups submitted to the induction of obesity and PD (MSG-F1, PD-F1, and MSG/PD-F1), which was more expressive in the groups with both diseases. These changes suggest a process of muscle degeneration that starts with the loss of cell shape as a result of the reorganization of sarcomeres that occurs during the adaptation process (52, 53). Few studies have analyzed the skeletal muscle of offspring born to rats with obesity and PD. Boaretto et al. (54) evaluated the effects of MSG-induced obesity on the soleus muscle of adult Wistar rats and observed the presence of amorphous fibers in obese animals; however, the authors did not find differentially stained sarcoplasm. We therefore suggest that the skeletal muscle alterations found in the present study may be due to fetal programming.

Animals of the MSG-F1, PD-F1 and MSG/PD-F1 groups exhibited central nuclei indicative of muscle fiber regeneration, which is the result of enhanced cell activity to increase the protein synthesis rate. The presence of nuclear activity in this tissue may indicate adaptive mechanisms after cell damage (55-57). Leite et al. (58), who evaluated the effect of ligature-induced PD on the soleus muscle of adult Wistar rats, also reported this alteration. These muscle fiber changes may be the results of fetal programming.

The results of morphometric analysis of the muscle fibers showed a 17% reduction in fiber density and a 38% increase in the capillary/fiber ratio in the PD-F1 group when compared to the CTL-F1 group. The first phase of the tissue repair process is characterized by an increase in vascularization, which is necessary to increase the blood supply to the skeletal muscle tissue (59). Hence, the results suggest that the increase in the capillary/fiber ratio in animals with PD was an attempt to trigger tissue repair.

Connective tissue is synthesized by fibroblasts and is located between muscle fibers. It is the main component of the extracellular matrix and plays a key role in maintaining the integrity of muscle fibers. However, excess connective tissue can influence muscle function (60, 61). In the present study, there was an increase in the percentage of connective tissue in animals that received MSG administration, with an increase of 51% in the MSG-F1 group compared to the CTL-F1 group and of 25% in the MSG/PD-F1 group compared to the PD-F1 group. Similar results have been reported by Boaretto et al. (54) who evaluated the effect of MSG-induced obesity on the soleus muscle of adult Wistar rats and observed an increase in connective tissue in obese animals. The increase in connective tissue may be related to the reduction in muscle fiber density as seen in the present study. Furthermore, excess connective tissue may have been a result of fetal programming due to obesity.

There were no morphological or morphometric alterations in NMJs between the groups studied. Animals submitted to the induction of obesity and PD, alone or in combination,

exhibited a smaller area and smaller major and minor diameters compared to the CTL-F1 group, although the differences were not statistically significant. Studies report alterations in the size of NMJs in metabolic and genetic diseases (62, 63). However, few studies have analyzed NMJs in the offspring of rats with obesity and PD. Studying the diaphragm muscle of Wistar rats with MSG-induced obesity, Oliveira et al. (64) found a reduction in the area and major diameter of the NMJs.

Obesity and PD are associated with low-grade systemic inflammation (10, 14), which causes an increase in inflammatory markers such as interleukin 6. Excess levels of this marker lead to a reduction in insulin-like growth factor 1 signaling (64), which plays an important role in the development and differentiation of myoblasts and in the neuromuscular system (66). The reduction in the NMJ parameters observed in the offspring of this study may have been due to the alterations caused by inflammation present in the dams, which triggered fetal programming and affected NMJ development.

Regarding the activity of ChE, there were no significant differences between the groups studied, suggesting that obesity and PD did not alter the amount of ChE in the synaptic cleft, did not induce changes in neurotransmission, and did not cause toxicity that would be characterized by the inhibition of enzymatic activity (67). Therefore, neither obesity nor PD interfered with offspring development in this study, maintaining neuromuscular integrity.

In view of the present results, we conclude that fetal programming due to obesity and PD exerted effects on EDL muscle fibers and connective tissue. In addition, the association of obesity and PD affected body parameters and EDL muscle length in the offspring, suggesting that inflammatory diseases can cause body and muscle changes. Obesity and PD, alone or in combination, also promoted degenerative changes in muscle fibers, which could compromise muscle function. Obesity led to an increase in the percentage of connective tissue, which was more expressive in the group submitted only to obesity induction, influencing the mechanism

of tissue regeneration. There were no alterations in ChE activity. Furthermore, no significant differences in NMJ parameters were observed; however, the results showed a reduction in the total area and major and minor diameters in the groups with obesity and PD alone or in combination, suggesting alterations in muscle function.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have no conflicts of interest to declare.

FUNDING INFORMATION

This work was carried out with financial support from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the scholarship program of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel CAPES for funding the research.

REFERENCES

1. Barker DJ. P. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med.* 2007; 261(5):412–417. DOI 10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17444880/>.
2. Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ, Barbieri MA. Developmental origins of health and disease (DOHaD). *J Pediatr.* 2007; 83(6):494-504. DOI 10.2223/JPED.1728 Available from: <https://www.scielo.br/j/jped/a/8yYgch9mB4pDhRBsRJJMHDw/?format=pdf>
3. Marciniak A, Patro-Malysza A, Kimber-Trojnar Z, Marciniak B, Oleszczuk J, Leszczynska-Gorzela B. Fetal programming of the metabolic syndrome. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2017; 56(2): 133-138. DOI: 10.1016/j.tjog.2017.01.001 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28420495/>.
4. Padmanabhan V, Cardoso RC, Puttabyatappa M. Developmental Programming, a Pathway to Disease. *Endocrinology.* 2016; 157 (4): 1326-1340. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1003> Available from: <https://academic.oup.com/endo/article/157/4/1328/2422412?login=true>.
5. Carolan-Olah M, Duarte-Gardea M, Lechuga J. A critical review: early life nutrition and prenatal programming for adult disease. *J Clin Nurs.* 2015. DOI: 10.1111/jocn.12951 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26255862/>.
6. Urrutia-Pereira M, Solé D. Deficiência de vitamina D na gravidez e o seu impacto sobre o feto, o recém-nascido e na infância. *Rev Paul Pediatr.* 2015; 33 (1). <https://doi.org/10.1016/j.rpped.2014.05.004> Available from: <https://www.scielo.br/j/rpp/a/zgjCh7Ld7ZdzFDdBFcv7DpH/?lang=pt>.
7. Who. World Health Organization. 2018. Obesity. Available from: <https://www.who.int/topics/obesity/en/>
8. Brasil, Ministério da Saúde. Pesquisa nacional de saúde: 2019 – Atenção primária à saúde e informações antropométricas: Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. Available from: <https://www.pns.icict.fiocruz.br/wp-content/uploads/2021/02/liv101758.pdf>.
9. White PAS, Brito LC. Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2013; 57(5). <https://doi.org/10.1590/S0004-27302013000500002> Available from: <https://www.scielo.br/j/abem/a/SbQ8SyBJK3fz5nNmyRN8fWw/abstract/?lang=pt>
10. Brandelero S, Bonfleur ML, Ribeiro RA, Vanzela EC, Nassar CA, Nassar PO, et al. Decreased TNF- α gene expression in periodontal ligature in MSG-obese rats: A possible protective effect of hypothalamic obesity. *Arch Oral Biol.* 2012. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.08.024 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22129469/>

11. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Cuppari C, Salpietro V, Filippeli M, et al. Obesity and breastfeeding: The strength of association. *Int J Mol Sci*. 2014. DOI: 10.3390/ijms16010378 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25548896/>
12. Patti ME. Intergenerational programming of metabolic disease: evidence from human populations and experimental animal models. *Cell Mol Life Sci*, 2013. 70(9), 1597-1608. DOI: 10.1007/s00018-013-1298-0 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23435955/>
13. Global burden of disease study. Incidência global, regional e nacional, prevalência e anos vividos com incapacidade para 328 doenças e lesões para 195 países, 1990-2016: uma análise sistemática para o Estudo Global de Carga de Doenças. *Lanceta*. 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32154-2 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28919117/>.
14. Dias P, Henriques P, Anjos LA, Burlandy L. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. *Cadernos de Saúde Pública*. 2017; 33 (7). <https://doi.org/10.1590/0102-311X00006016> Available from: <https://www.scielo.br/j/csp/a/Q7r6YWsjSR5GZ9bJFBr6ckm/abstract/?lang=pt>
15. Genco R, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A Proposed Model Linking Inflammation to Obesity, Diabetes, and Periodontal Infections. *J Periodontol*. 2005; 76 (11): 2075-2084. DOI: 10.1902/jop.2005.76.11-S.2075 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16277579/>.
16. Dahiya P, Kamal R, Gupta R. Obesity, periodontal and general health: Relationship and management. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012; 16(1). DOI 10.4103/2230-8210.91200 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3263203/>.
17. De Castilhos ED, Horta BL, Gigante DP, Demarco FF, Peres KG, Peres MA. Association between obesity and periodontal disease in young adults: a population-based birth cohort. *J Clin Periodontol*, 2012; 39(8): 717-724. DOI 10.1111/j.1600-051X.2012.01906.x. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3468720/>.
18. Moura-Grec PG, Marsicano JA, Carvalho CAP, Sales-Peres SHC. Obesity and periodontitis: systematic review and meta-analysis. *Cien Saude Colet*. 2014; 19(6): 1763-1772. DOI: 10.1590/1413-81232014196.13482013. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24897477/>.
19. Cardozo CP, Graham ZA. Muscle–bone interactions: Movement in the field of mechano–humoral coupling of muscle and bone. *Ann N Y Acad Sci*. 2017; 1402(1): 10–17. DOI: 10.1111/nyas.13411. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28763828/>
20. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*. 2015; 96(3): 183-195. DOI: 10.1007/s00223-014-9915-y. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25294644/>.

21. Ward SS, Stickland NC. Why are slow and fast muscles differentially affected during prenatal undernutrition? *Muscle Nerve*. 1991; 14(3): 259-267. DOI: 10.1002/mus.880140310. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2041547/>
22. Olney J. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 1969; 164(3880): 719-721. DOI: 10.1126/science.164.3880.719 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5778021/>.
23. Lee HJ, Jun JK, Lee SM, Ha JE, Paik D, Bae KH. Association Between Obesity and Periodontitis in Pregnant Females. *J Periodontol*. 2014. 85 (7): 224-231. DOI: 10.1902/jop.2014.130578. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24502613/>.
24. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of Endocrinology*. 1968 40(4), 527-528. DOI: 10.1677/joe.0.0400527 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4868415/>
25. Lana ADC, Paulino CA, Gonçalves ID. Influência dos exercícios físicos de baixa e alta intensidade sobre o limiar de hipernocicepção e outros parâmetros em ratos. *Rev Bras Med Esporte*. 2006. 12(5), 248-254. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922006000500005>. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbme/a/T34QCY7MqPZW4kLkgYx3Zff/?lang=pt>.
26. Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, Aquino SG, Andia DC, Muscara MN, et al. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res*. 2009; 44 (4): 479-488. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2008.01143.x. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19076990/>.
27. Karnovski MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 1965; 27: 1-149.
28. Junqueira LC, Junqueira LMM. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1983.
29. Fernandes T, Roque FR, Magalhães FC, Carmo EC, Oliveira EM. O treinamento físico aeróbico corrige a rarefação capilar e as alterações nas proporções dos tipos de fibra muscular esquelética em ratos espontaneamente hipertensos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2012; 18 (4): 267-272. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922012000400010>. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbme/a/L3G4DywhMPLvHKqZC8MDB3x/abstract/?lang=pt>
30. Bancroft JD, Steven A. Theory and practice of histological techniques. 3rd ed. Churchill Livingstone: Edinburg. 1990.
31. Lehrer GM, Ornstein L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. *J Biophys Biochem Cytol*. 1959; 6: 399-419. DOI: 10.1083/jcb.6.3.399 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14415404/>

32. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;16:248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273?via%3Dihub>
33. Ellman GL, Courtney KD, Jr VA, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7: 88–95. DOI: 10.1016/0006-2952(61)90145-9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13726518/>.
34. Herbert A. Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. *Angew Zool.* 1995; 3: 1–5. | DOI:10.5894/rgci430. Available from: https://www.aprh.pt/rgci/pdf/rgci-430_Jebali.pdf.
35. Hamaoka K, Kusunoki T. Morphological and cell proliferative study on the growth of visceral organs in monosodium L-glutamate-treated obese mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1986; 32 (4): 395-411. DOI: 10.3177/jnsv.32.395. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3806254/>
36. Maiter D, Underwood LE, Martin JB, Koenig JI. Neonatal Treatment with Monosodium Glutamate: Effects of Prolonged Growth Hormone (GH)-Releasing Hormone Deficiency on Pulsatile GH Secretion and Growth in Female Rats. *Endocrinology*. 1991; 128: 1100-1106. <https://doi.org/10.1210/endo-128-2-1100>. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-abstract/128/2/1100/2534676?login=false>
37. Mattia TM, Leite MA, Nassar PO, Sagae SC, Alegre-Maller ACP, Pandini JH, et al. The Influence of Obesity Induced by Monosodium Glutamate in Periodontal Tissues of Female Wistar Rats with Experimental Periodontitis. *Am Int J Contemp Res.* 2017; 7(3): 28-40. Available from: https://www.aijcrnet.com/journals/Vol_7_No_3_September_2017/5.pdf.
38. Coradini JG, Karvat J, Brancalhão RMC, Ribeiro LFC, Bonfleur ML, Bertolini GRF. Características nociceptivas e histomorfométricas de nervos medianos de ratos com obesidade induzida pelo glutamato monossódico. *Scientia Medica.* 2014; 24(4): 368-372. <https://doi.org/10.15448/1980-6108.2014.4.18429>. Available from: <https://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/view/18429>.
39. Bonfleur ML, Ribeiro RA, Pavallo A, Soster R, Lubaczeuski C, Araujo ACF, et al. Duodenal-jejunal by-pass restores insulin action and betacell function in hypothalamic-obese rats. *Obes Surg.* 2015; 25: 656-665. DOI: 10.1007/s11695-014-1427-3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25204409/>.
40. Pimentel GD, Ropelle ER, Rocha GZ, Carvalheira JBC. The role of neuronal AMPK as a mediator of nutritional regulation of food intake and energy homeostasis. *Metabolism.* 2013; 62(2): 171-178. DOI: 10.1016/j.metabol.2012.07.001. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22898253/>.

41. Costa KF, Bonfleur ML, Pontillo V, Pedrotti S, Bernardon P, Brancalão R, et al. Evaluation of Periodontal Tissues and Abdominal Aorta of Rats with Induced Obesity by Monosodium Glutamate and Experimental Periodontitis. *J Adv Med Med Res.* 2017; 19 (2): 1-14. DOI:10.9734/BJMMR/2017/30165. Available from: https://www.researchgate.net/publication/312167935_Evaluation_of_Periodontal_Tissues_and_Abdominal_Aorta_of_Rats_with_Induced_Obesity_by_Monosodium_Glutamate_and_Experimental_Periodontitis
42. Reid IR. Relationship between fat and bone. *Osteoporos Int.* 2008; 19(5): 595-606. DOI: 10.1007/s00198-007-0492-z. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17965817/#:~:text=Abstract,it%20alongside%20age%20in%20importance.>
43. Zhao LJ, Jiang H, Papasian CJ, Maulik D, Drees B, Familton J, Deng HW. Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2008; 23(1): 17-29. DOI: 10.1359/jbmr.070813 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17784844/>.
44. Bertasso IM. Efeito da intervenção cirúrgica bariátrica sobre o metabolismo lipídico hepático materno de ratas obesas e sua repercussão sobre a prole. Dissertação (Mestrado) – Cascavel: Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2017.
45. Puertas A, Magan-Fernandez A, Blanc V, Revelles L, O´Valle, Pozo E, et al. Association of periodontitis with preterm birth and low birth weight: a comprehensive review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017; 31(5): 597-602. DOI: 10.1080/14767058.2017.129302. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28282773/>.
46. Manrique-Corredor EJ, Orozco-Beltran D, Lopez-Pineda A, Quesada JA, Gil-Guillen VF, Carratala-Munuera C. Maternal periodontitis and preterm birth: Systematic review and meta-analysis. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2019; 47(3): 243- 251. DOI: 10.1111/cdoe.12450. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30812054/>.
47. Vickers MH. Developmental Programming and Transgenerational Transmission of Obesity. *Ann Nutr Metab.* 2014; 64(1): 26-34. DOI: 10.1159/000360506. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25059803/>.
48. Campos KE, Sinzato YK, Pimenta W de P, Rudge MV, Damasceno DC. Effect of maternal obesity on diabetes development in adult rat offspring. *Life Sci.* 2007; 81(19): 473-1478. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.09.016. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17961602/>
49. Campos KE, Volpato GT, Calderon IM, Rudge MV, Damasceno DC. Effect of obesity on rat reproduction and on the development of their adult offspring. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41(2): 122-125. DOI: 10.1590/s0100-879x2008005000001. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18235969/>.
50. Puttabyatappa M, Cardoso RC, Padmanabhan V. Effect of maternal PCOS and PCOS-like phenotype on the offspring's health *Mol Cell Endocrinol.* 2016; 5 (435): 29-39.

DOI: 10.1016/j.mce.2015.11.030. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26639019/>.

51. Tang WY, Ho SM. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007; 8:173–182 DOI: 10.1007/s11154-007-9042-4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4056338/>.
52. Aguiar AF, Aguiar DH. Plasticidade muscular no exercício físico. *R. bras. Ci. e Mov.* 2009; 17 (3): 104 -113. DOI: <https://doi.org/10.18511/rbcm.v17i3.1226>. Available from: <https://portalrevistas.ucb.br/index.php/RBCM/article/view/1226>
53. Coutinho EL, Gomes ARS, França CN, Oishi J, Salvini TF. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *J Med Biol Res.* 2004; 37 (12): 1853-1861. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004001200011>. Available from: <https://www.scielo.br/j/bjnbr/a/XcypRMmktRWdWYJwbPJGQk/?lang=en>
54. DeGirolami UU, Smith TW. Teaching monograph: pathology of skeletal muscle diseases. *Am J Pathol.* 1982; 107(2): 231-276. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1916001/>.
55. Boaretto ML, Andrade BZ, Maciel JIHN, Moha I, Schneider SCS, Torrejais MM, et al. Effects of vibratory platform training on the histomorphometric parameters of the soleus muscle in obese Wistar rats. *Sport Sci Health.* 2020; 16: 501-510. <https://doi.org/10.1007/s11332-020-00632-8>. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11332-020-00632-8>.
56. Arthur, ST, Cooley ID, The Effect of Physiological Stimuli on Sarcopenia; Impact of Notch and Wnt Signaling on Impaired Aged Skeletal Muscle Repair. *Int J Biol Sci.* 2012; 8(5): 731-760. DOI:10.7150/ijbs.4262. Available from: <https://www.ijbs.com/v08p0731.htm>.
57. Gundersen K. Muscle memory and a new cellular model for muscle atrophy and hypertrophy. *J Exp Biol.* 2016; 219 (Pt 2): 235-242. DOI: 10.1242/jeb.124495 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26792335/>.
58. Messier V, Rabasa-Lhoret R, Barbat-Artigas S, Elisha B, Karelis AD, Aubertin-Leheudre M. Menopause and sarcopenia: A potential role for sex hormones. *Maturitas.* 2011; 68 (4): 331-336. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21353405/>.
59. Leite MA, Mattia TM, Kakihata CMM, Bortolini BM, Rodrigues PHC, Bertolini GRF, et al. Experimental periodontitis in the potentialization of the effects of immobilism in the skeletal striated muscle. *Inflammation.* 2017; 40 (6): 2000-2011. DOI: 10.1007/s10753-017-0640-3 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28822015/>.
60. Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17 (3): 165-178. DOI: 10.1038/nri.2016.150. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28163303/>.

61. Slimani L, Micol D, Amat J, Delcros G, Meunier B, Taillandier D, et al. The worsening of tibialis anterior muscle atrophy during recovery post-immobilization correlates with enhanced connective tissue area, proteolysis, and apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 303(11): 1335-E1347. DOI: 10.1152/ajpendo.00379.2012. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23032683/>.
62. Mutsaers SE, Bichop JE, McGrouther G, Laurent GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29(1): 5-17. DOI: 10.1016/s1357-2725(96)00115-x Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9076937/>
63. Lesniewski LA, Miller TA, Armstrong RB. Mechanisms of force loss in diabetic mouse skeletal muscle. *Muscle Nerve.* 2003; 28(4): 493–500. DOI: 10.1002/mus.10468 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14506722/>.
64. Deschenes MR, Roby MA, Glass EK. Aging influences adaptations of the neuromuscular junction to endurance training. *Neuroscience.* 2011; 190: 56-66. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.05.070. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3156295/>.
65. Oliveira MC. Efeito do treinamento com plataforma vibratória na morfologia do músculo diafragma em ratos com obesidade hipotalâmica [Dissertação on the Internet]. Cascavel: Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2020 [cited 2023 Jan 30]. 111 s. Available from: <https://tede.unioeste.br/handle/tede/5631> Mestrado em Biociências e Saúde.
66. Maggio M, Vita F, Lauretani F, Butto V, Bondi G, Cattabiani C, et al. IGF1, the Cross Road of the Nutritional, Inflammatory and Hormonal Pathways to Frailty. *Nutrients* 2013;5(10):4184-4205. DOI: 10.3390/nu5104184. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24152751/>
67. Caroni, P. Activity-sensitive signaling by muscle-derived insulin-like growth factors in the developing and regenerating neuromuscular system. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1993; 692: 209-222. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb26219.x Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8215024/>
68. Monteiro DA, Almeida JÁ, Rantin FT, Kalinin, AL. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2006; 143 (2): 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.01.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S153204560600024X?via%3Di> hub

Table 1 – Body parameters of 77-day-old dams of the control (CTL), MSG-induced obesity (MSG), periodontitis (PD), and MSG-induced obesity + periodontitis (MSG/PD) groups.

Body parameters	CTL (n=10)	MSG (n=7)	PD (n=14)	MSG/PD (n=7)
Body weight (g)	245.0 ± 13.8 ^a	200.9 ± 21.3 ^b	257.5 ± 17.8 ^a	200.9 ± 20.1 ^b
Nasoanal length (cm)	19.4 ± 0.52 ^a	17.3 ± 0.39 ^b	19.0 ± 0.88 ^a	17.5 ± 0.58 ^b
Lee index	322.6 ± 7.68 ^a	338.6 ± 15.21 ^a	337.7 ± 19.36 ^a	334.6 ± 12.51 ^a
Retroperitoneal and periepididymal fat (%)	1.71 ± 0.53 ^a	3.53 ± 1.03 ^b	1.84 ± 0.61 ^a	2.82 ± 0.33 ^b

Values are expressed as mean ± standard deviation. The Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test were used for the comparison of nasoanal length and two-way ANOVA followed by Tukey's post-test for the other variables. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

Table 2 – Macroscopic parameters of 120-day-old offspring of the control (CTL-F1), MSG-induced obesity (MSG-F1), periodontitis (PD-F1), and MSG-induced obesity + periodontitis (MSG/PD-F1) groups.

Macroscopic parameters	CTL-F1(n=7)	MSG-F1 (n=7)	PD-F1 (n=7)	MSG/PD-F1 (n=8)
Body weight (g)	384.9 ± 33.6 ^a	352.9 ± 20.2 ^a	390.9 ± 37.9 ^b	354.5 ± 14.3 ^a
Nasoanal length (cm)	23.6 ± 0.69 ^a	23.4 ± 0.63 ^a	23.8 ± 0.86 ^a	23.4 ± 0.52 ^a
Lee index	307.5 ± 8.74 ^a	302.5 ± 7.98 ^a	307.2 ± 5.94 ^a	302.8 ± 5.24 ^a
Retroperitoneal and periepididymal fat (%)	2.96 ± 0.24 ^{ab}	2.61 ± 0.31 ^a	3.11 ± 0.35 ^b	2.13 ± 0.51 ^c
EDL muscle weight (mg)	163.7 ± 15.8 ^a	149.1 ± 11.0 ^a	164.7 ± 18.6 ^a	147.8 ± 16.0 ^a
EDL muscle length (mm)	28.8 ± 1.43 ^a	26.8 ± 1.41 ^a	26.2 ± 1.22 ^a	20.5 ± 8.24 ^b

Values are expressed as mean ± standard deviation. Two-way ANOVA and Tukey's post-test. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

Table 3 – Microscopic parameters of the extensor digitorum longus muscle of 120-day-old offspring of the control (CTL-F1), MSG-induced obesity (MSG-F1), periodontitis (PD-F1), and MSG-induced obesity + periodontitis (MSG/PD-F1) groups.

Microscopic parameters	CTL-F1(n=6)	MSG-F1 (n=6)	PD-F1 (n=6)	MSG/PD-F1 (n=6)
Muscle fiber area (μm^2)	2114.1 \pm 420.9 ^a	2343.5 \pm 293.2 ^a	2320.4 \pm 295.5 ^a	2373.9 \pm 167.6 ^a
Major diameter of the muscle fiber (μm)	63.4 \pm 7.49 ^a	68.1 \pm 5.42 ^a	68.3 \pm 7.45 ^a	67.0 \pm 4.25 ^a
Minor diameter of the muscle fiber (μm)	40.4 \pm 4.05 ^a	42.6 \pm 2.32 ^a	42.0 \pm 1.84 ^a	42.8 \pm 0.76 ^a
Fiber density	541 \pm 102.9 ^a	469 \pm 47.0 ^a	451 \pm 29.2 ^b	464 \pm 29.2 ^a
Number of peripheral nuclei	710 \pm 116.5 ^a	664 \pm 47.2 ^a	669 \pm 64.2 ^a	699 \pm 67.4 ^a
Number of central nuclei	1.17 \pm 1.2 ^a	2.7 \pm 1.3 ^a	3.0 \pm 1.8 ^a	2.5 \pm 1.4 ^a
Nucleus/fiber ratio	1.32 \pm 0.07 ^a	1.42 \pm 0.06 ^a	1.48 \pm 0.19 ^a	1.50 \pm 0.13 ^a
Total number of capillaries	67.3 \pm 7.53 ^a	74.2 \pm 9.23 ^a	82.2 \pm 23.57 ^a	71.8 \pm 26.44 ^a
Capillary/fiber ratio	0.13 \pm 0.03 ^a	0.16 \pm 0.01 ^a	0.18 \pm 0.04 ^b	0.14 \pm 0.04 ^a
Connective Tissue (%)	2.95% \pm 0.33 ^a	4.46% \pm 0.26 ^b	3.48% \pm 0.34 ^a	4.36% \pm 0.39 ^b

Values are expressed as mean \pm standard deviation. Two-way ANOVA followed by Tukey's post-test. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

Table 4 – Morphometric parameters of the neuromuscular junctions (NMJs) of the extensor digitorum longus (EDL) muscle of 120-day-old offspring of the control (CTL-F1), MSG-induced obesity (MSG-F1), periodontitis (PD-F1), and MSG-induced obesity + periodontitis (MSG/PD-F1) groups.

Morphometric parameters	CTL-F1 (n=7)	MSG-F1 (n=7)	PD-F1 (n=7)	MSG/PD-F1(n=7)
Area of NMJs (μm^2)	462.1 \pm 124.0 ^a	383.9 \pm 84.9 ^a	372.0 \pm 69.8 ^a	392.5 \pm 109.1 ^a
Major diameter of the NMJs (μm)	39.5 \pm 4.7 ^a	35.4 \pm 4.1 ^a	37.2 \pm 3.4 ^a	37.2 \pm 4.3 ^a
Minor diameter of the NMJs (μm)	18.1 \pm 3.3 ^a	15.5 \pm 2.5 ^a	16.4 \pm 2.1 ^a	17.4 \pm 2.9 ^a
ChE enzyme activity (Nmol.min ⁻¹ .mg of protein ⁻¹)	5.7 \pm 0.8 ^a	5.7 \pm 1.7 ^a	5.6 \pm 1.2 ^a	5.6 \pm 1.1 ^a

Values are expressed as mean \pm standard deviation. Two-way ANOVA and Tukey's post-test. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$).

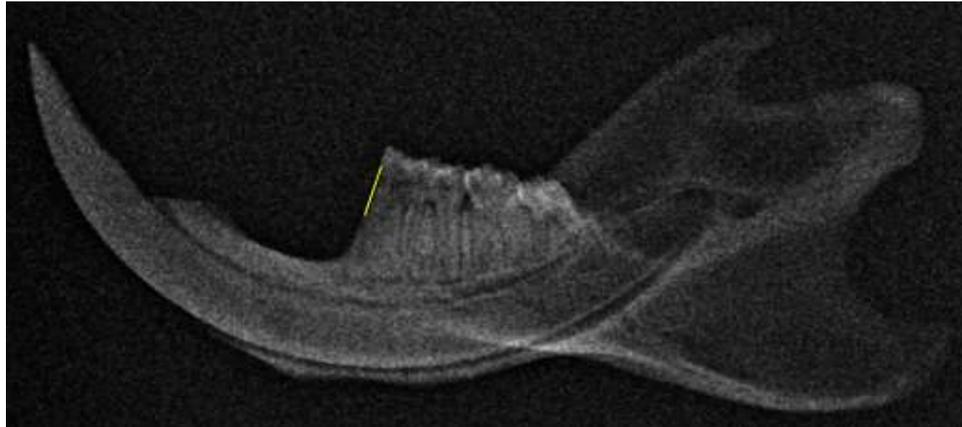


Figure 1 – Radiograph of the hemimandible of 120-day-old Wistar rats. The yellow line shows the distance from the cemento-enamel junction to the alveolar bone crest on the mesial side of the left mandibular first molar, which was used for the demonstration of periodontitis.

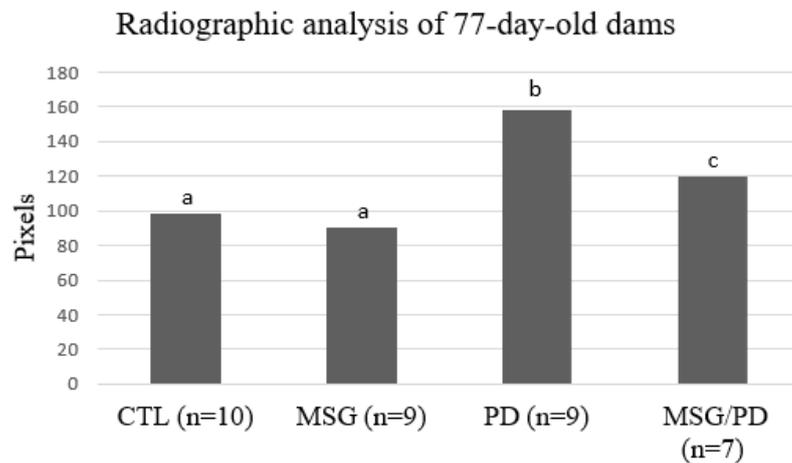


Figure 2 – Radiographic analysis of 77-day-old dams of the control (CTL), MSG-induced obesity (MSG), periodontitis (PD), and MSG-induced obesity + periodontitis (MSG/PD) groups.

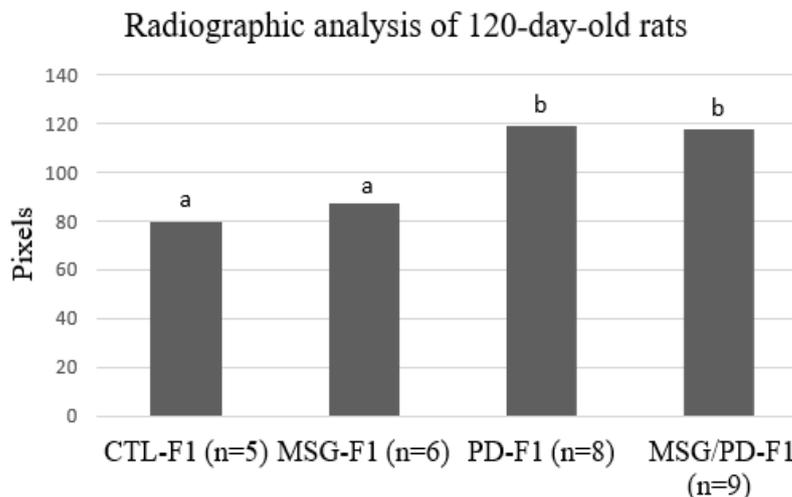


Figure 3 – Radiographic analysis of 120-day-old rats of the control (CTL-F1), MSG-induced obesity (MSG-F1), periodontitis (PD-F1), and MSG-induced obesity + periodontitis (MSG/PD-F1) groups.

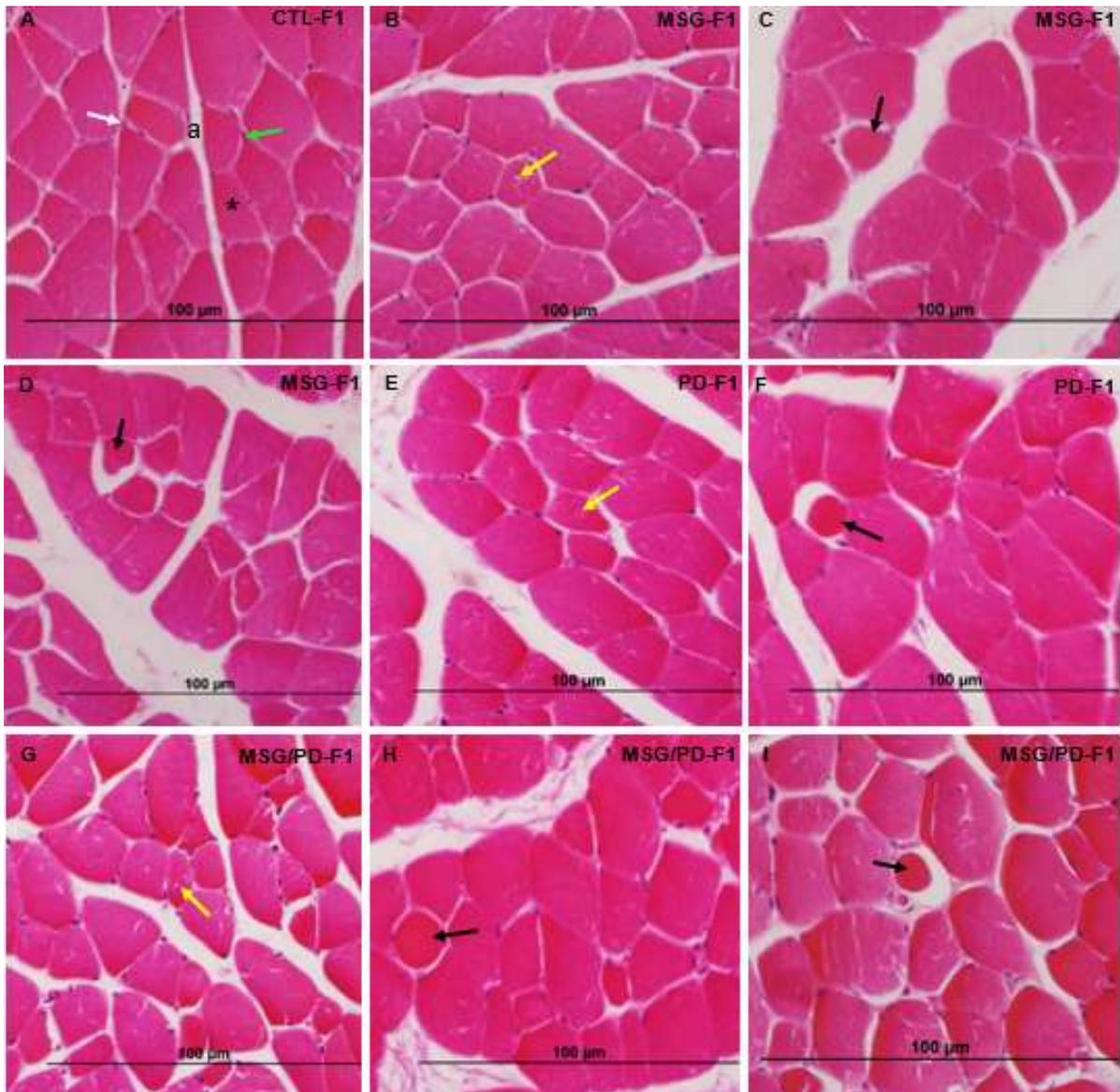


Figure 4 – Photomicrographs of cross-sections of the extensor digitorum longus muscle of rats at 120 days of age. Hematoxylin-eosin. Control group (CTL-F1), MSG-induced obesity group (MSG-F1), periodontitis group (PD-F1), and MSG-induced obesity + periodontitis group (MSG/PD-F1). **A:** Muscle fibers with a polygonal shape (asterisk), peripheral nucleus (green arrow), perimysium (letter *a*), and capillary (white arrow). **B, E, G:** Central nucleus (yellow arrow). **C, D, F, H, I:** Amorphous fiber (black arrow).

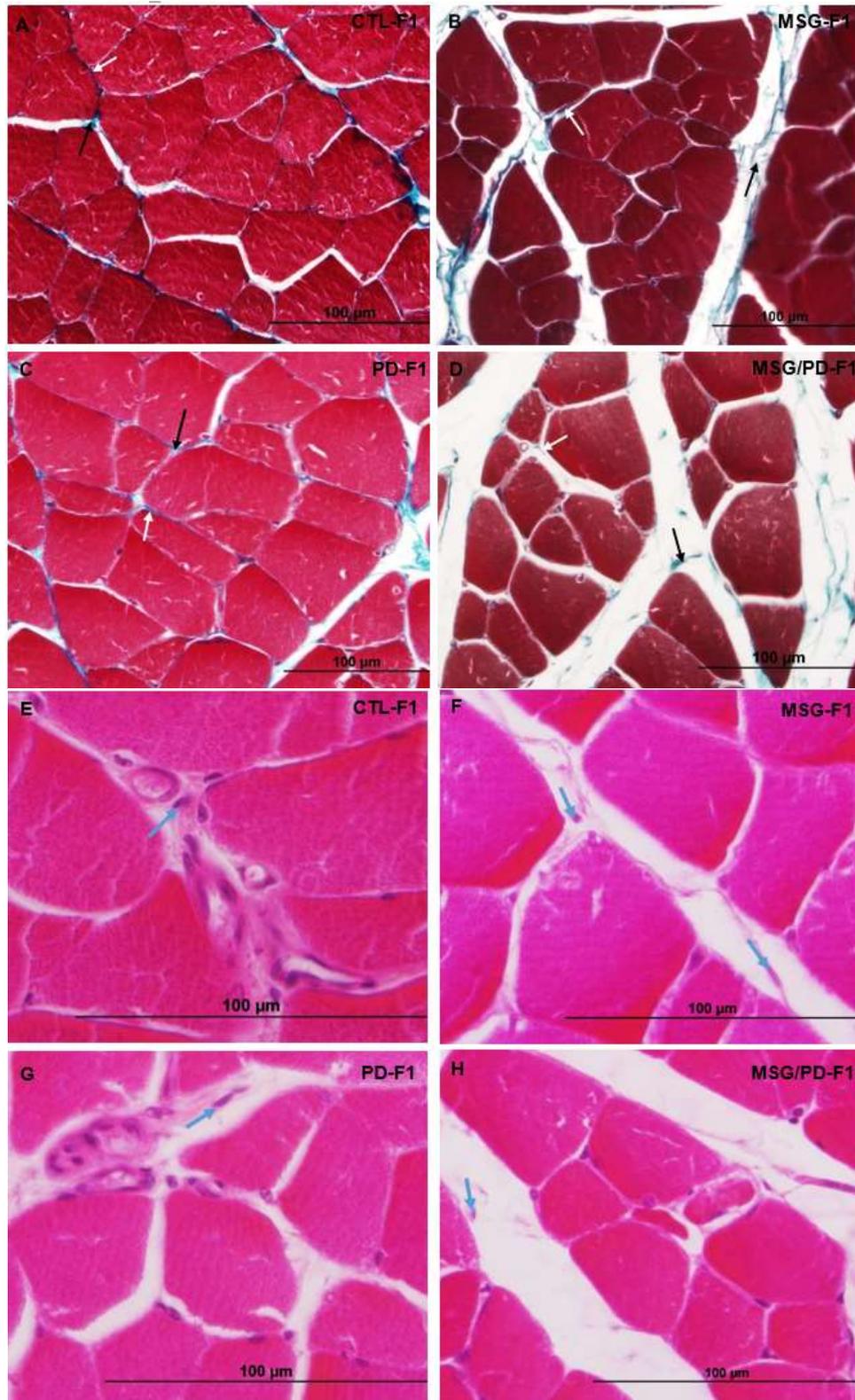


Figure 5 – Photomicrographs of cross-sections of the extensor digitorum longus muscle of rats at 120 days of age. Control group (CTL-F1), MSG-induced obesity group (MSG-F1), periodontitis group (PD-F1), and MSG-induced obesity + periodontitis group (MSG/PD-F1). **A, B, C, D:** Observe connective tissue in the perimysium (black arrow) and endomysium (white arrow). Masson’s trichrome. **E, F, G, H:** Observe fibroblasts in connective tissue. Hematoxylin-eosin.

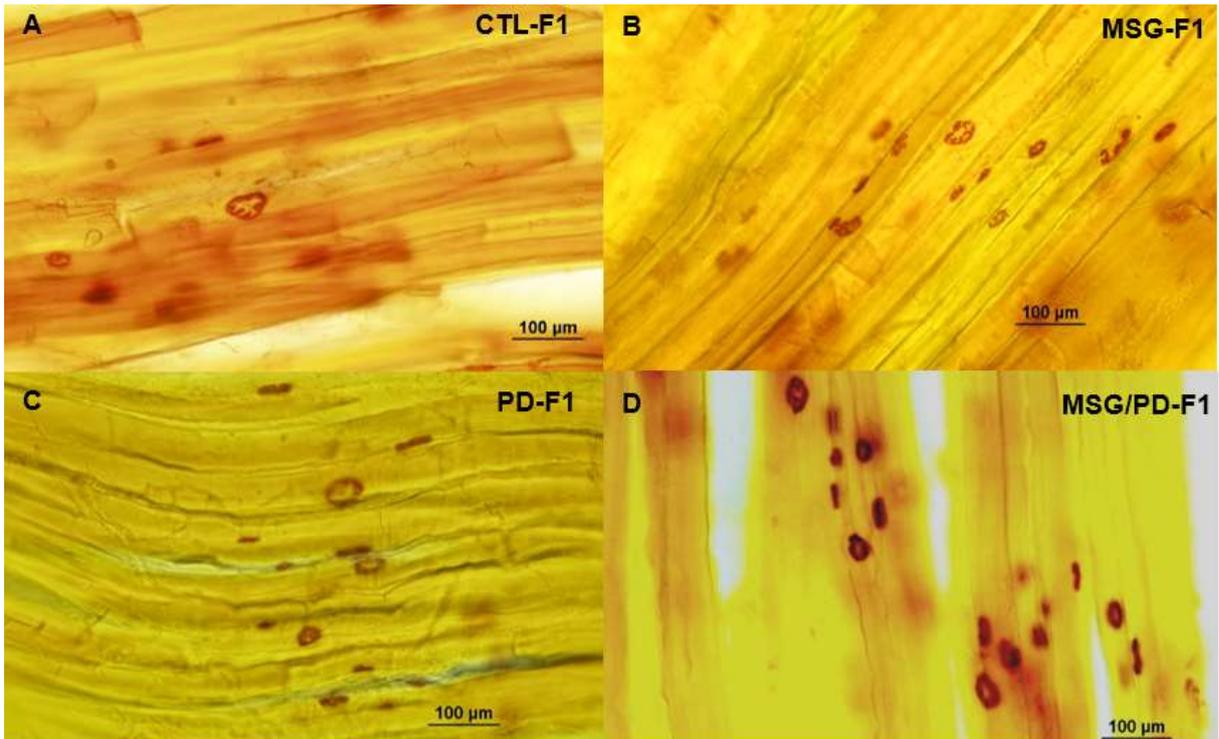


Figure 6 – Photomicrographs of neuromuscular junctions (NMJs) in longitudinal sections of the extensor digitorum longus muscle of rats at 120 days of age. Nonspecific esterase. Control group (CTL-F1), MSG-induced obesity group (MSG-F1), periodontitis group (PD-F1), and MSG-induced obesity + periodontitis group (MSG/PD-F1). **A, B, C, D:** Observe the NMJs with oval, elliptical, and round shapes.

CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES FINAIS

Conclui-se que a PF causada pela obesidade e PE provocou efeitos na morfologia e morfometria das fibras musculares e no tecido conjuntivo do músculo ELD de ratos *Wistar*. A associação das doenças causou alterações no peso corporal, nas gorduras retroperitoneal e periepídimal e no comprimento do músculo ELD, sugerindo que doenças inflamatórias podem causar efeitos nos parâmetros corporais e na musculatura.

A obesidade e a PE isoladas e/ou associadas causaram alterações morfológicas nas fibras musculares. Já na morfometria, somente os animais com periodontite tiveram alterações na densidade das fibras e relação capila/fibra. Os animais que foram induzidos à obesidade tiveram aumento do tecido conjuntivo, no entanto, de forma isolada, o aumento foi mais expressivo.

Apesar das JNMs e da atividade da enzima ChE não apresentarem diferenças significativas, os grupos com obesidade e PE isoladas e/ou associadas mostraram que as JNMs tiveram redução na área e diâmetros maior e menor.

Essas alterações nas fibras musculares, no tecido conjuntivo e nas JNMs podem causar prejuízos na função muscular.

REFERÊNCIAS

ABELLA, V. *et al.* Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immunorelation to environmental and systemic conditions. **Journal of clinical system disorders. Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 2, p. 100, 2017. DOI: 10.1038 / nrrheum.2016.209. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28053336/>. Acesso em: 10 out. 2021.

ALBANDAR, J. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. **Journal Periodontoly**. 2000, [s. l.], v. 29, p. 177-206, 2002. DOI 10.1034/j.1600-0757.2002.290109.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12102708/>.

ALVES, P. *et al.*, The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. **Jornal de pediatria**, v. 84, n. 3, p. 264-271, 2008. DOI: 10.2223 / JPED.1769. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18392347/>.

AL-ZAHRANI, M. S. *et al.*, Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. **Journal of periodontology**, v. 74, n. 5, p. 610-615, 2003. DOI: 10.1902 / jop.2003.74.5.610. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12816292/>.

ASHLEY F.W.; KANNEL W.B. Relation of weight change to changes in atherogenic traits: the Framingham study. **Journal of Chronic Diseases**. 1974; 27: 103-114. DOI: 10.1016/0021-9681(74)90079-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4830839/>.

BAHIA, L.; ARAÚJO, D. Impacto econômico da obesidade no Brasil. **Revista HUBE**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, 2014. DOI 10.12957/rhupe.2014.9793. Disponível em: <file:///C:/Users/Windows%2010/OneDrive/%C3%81rea%20de%20Trabalho/Mestrado/Projeto/Artigos%20para%20o%20projeto/Obesidade/BAHIA%202014.pdf>.

BARKER DJ. P. The origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**. 2007; 261-5:412–417. DOI: 10.1111 / j.1365-2796.2007.01809.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17444880/>.

BAYOL, S. *et al.*, A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. **Journal Physiology**, v. 567, n. 3, p. 951-961, 2005. DOI: 10.1113 / jphysiol.2005.088989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16020464/>. Acesso em: 11 out. 2021.

BECHARA, G. H; SZABÓ, M. P. J. Processo inflamatório. **Unesp**, [s. l.], 2006. Disponível em: https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/GERVASIOHENRIQUEBECHARA/inflam_aspectosvasculares2006.pdf

BERCHTOLD, M. *et al.* Calcium Ion in Skeletal Muscle: Its Crucial Role for Muscle Function, Plasticity, and Disease. **Physiological Reviews**, [s. l.], 1 jul. 2000. DOI 10.1152/physrev.2000.80.3.1215. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.2000.80.3.1215>.

BERTOLINI, P. F. R. *et al.* Periodontal disease and obesity: there is a relationship?. **Revista Ciências Médicas**, v. 19, n. 1-6, p. 65-72, jan/dez. 2010. Disponível em: <http://www.puc-campinas.edu.br/.../>

BEZERRA, M. M. *et al.* Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontology**, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, 2000. DOI: 10.1902 / jop.2000.71.6.1009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10914805/>.

BRANDÃO, L.U.A *et al.* Changes in the soleus muscular tissue of rats with experimental periodontitis under physical exercise influences / Cambios en el tejido muscular del sóleo de las ratas con periodontitis experimental bajo influencia del ejercicio físico. **Archivos de medicina del deporte**, [s. l.], p. 267-273, 2017. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-170316>.

BOARETTO, M.L. Effects of vibratory platform training on the histomorphometric parameters of the soleus muscle in obese Wistar rats. **Sport Sciences for Health**, [s. l.], p. 501-510, 19 mar. 2020. DOI <https://doi.org/10.1007/s11332-020-00632-8>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11332-020-00632-8>.

BOIS, T. M. Du; HUANG, X.-F. Early brain development disruption from NMDA receptor hypofunction : Relevance to schizophrenia. **Brain research reviews**, v. 53, n. 260–270, 2007. DOI: 10.1016 / j.brainresrev.2006.09.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17014910/>.

BONFLEUR, M.L.; *et al.* Duodenal-jejunal by-pass restores insulin action and betacell function in hypothalamic-obese rats. **Obesity Surgery**, v. 25, p. 656-665, 2015. DOI: 10.1007 / s11695-014-1427-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25204409/>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Pesquisa nacional de saúde: 2019 - Atenção primária à saúde e informações antropométricas: Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: **IBGE, 2020**. Disponível em: <https://www.pns.icict.fiocruz.br/wp-content/uploads/2021/02/liv101758.pdf>.

BRANDELERO, S. *et al.* Decreased TNF- α gene expression in periodontal ligature in MSG-obese rats: A possible protective effect of hypothalamic obesity. **Arch Oral Biol**. 2012. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/90203>.

CALKINS, K.; DEVASKAR, S. Fetal Origins of Adult Disease. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 158-176, jul. 2011. DOI 10.1016 / j.cppeds.2011.01.001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4608552/>.

CALTON, E. K. *et al.* Certain dietary patterns are beneficial for the metabolic syndrome: reviewing the evidence. **Nutrition Research**. v. 34, p. 559–568, 2014. DOI: 10.1016 / j.nutres.2014.06.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25150114/>.

CARRANZA, F. A. **Periodontia Clínica de Glickman**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Interamericana, p. 968, 1983.

CARDOZO, C. P.; GRAHAM, Z. A. Muscle–bone interactions: Movement in the field of mechano–humoral coupling of muscle and bone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1402, n. 1, p. 10–17, 2017. DOI: 10.1111/nyas.13411.

CAROLAN-OLAH, M.; DUARTE-GARDEA, M.; LECHUGA, J. A critical review: early life nutrition and prenatal programming for adult disease. **Journal of clinical nursing**, [s. l.], Dec. 2015. DOI 10.1111/jocn.12951. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26255862/>.

CATALANO P.M. Obesity and pregnancy--the propagation of a viscous cycle? **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2003; 88-8: 3505-3506. DOI: 10.1210/jc.2003-031046. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12915626/>.

CHAPPLE, I. L. C. *et al.* Periodontal health and gingival diseases and conditions on a intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J clin periodontol**, Copenhagen, v. 45, n. 20, p. 68-77, 2018. DOI: 10.1002/JPER.17-0719. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29926944>.

CHANG, Y.C. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. **Journal of Periodontal Research**, v.37, n.3, p.196- 203, 2002.

CHEN, W. *et al.* Effects of CB1 receptor blockade on monosodium glutamate induced hypometabolic and hypothalamic obesity in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. v. 386, p. 721–32,2013. DOI:10.1007/s00210-013-0875-y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23620336/>.

COLOMBO A. *et al.* Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance Microbial Pathogenesis. **Rev. Elsevier**, 10.ed., 2015. DOI: 10.1016 / j.micpath.2015.09.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26416306/>.

CRAIG, R. G. *et al.* Periodontal diseases and systemic inflammation. In: Seminars in dialysis. **Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd**, p. 23-28. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl604>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ndt/article/22/2/312/1888505?login=true>.

DAVE K.R., SYAL A.R., KATYARE S.S. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. **Zeitschrift für Naturforschung** 5. 55c, 100-108,

2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10739108/>

DAHIYA, P.; KAMAL, R.; GUPTA, R. Obesity, periodontal and general health: Relationship and management. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 16, n. 1, jan/feb 2012. DOI 10.4103/2230-8210.91200. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3263203/>.

DE CASTILHOS, E. D. *et al.* Association between obesity and periodontal disease in young adults: a population-based birth cohort. **Journal of clinical periodontology**, v. 39, n. 8, p. 717-724, 2012. DOI 10.1111 / j.1600-051X.2012.01906.x. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3468720/>.

DESCHENER, M.R, ROBY, M.A, GLASS, E.K. Aging influences adaptations of the neuromuscular junction to endurance training. **Neuroscience**. 190: 56-66, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3156295/>.

DIAS, P. *et al.* Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 33, n. 7, 2017. DOI <https://doi.org/10.1590/0102-311X00006016>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/Q7r6YWsjSR5GZ9bJFBr6ckm/a>

EL-KHANI, U. *et al.* The Impact of obesity surgery on musculoskeletal disease. **Obesity Surgery**, v. 24, n. 12, p. 2175-2192, 2014. DOI: 10.1007 / s11695-014-1451-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25308113/>.

FERNANDEZ, M. *et al.*, Avaliação da gordura corporal em pacientes obesas no pré-operatório de cirurgia bariátrica. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva**, v.29, n.1, p.59-61, 2016.

FIEHN, N. E.; KLAUSEN, B.; EVANS, R. T. Periodontal bone loss in Porphyromonas gingivalis-infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous Streptococcus sanguis. **J Periodontal Res**, v.27, n. 6, p. 609-614, 1992.

FRANÇA, L. M. *et al.* Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 443, n. 2, p. 725–730, 2014. DOI: 10.1016 / j.bbrc.2013.12.042. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24333444/>.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. **Calcified tissue international**, v. 96, n. 3, p. 183-195, 2015. DOI: 10.1007 / s00223-014-9915-y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25294644/>.

FOUREAUX, R. C., *et al.* Comparação de métodos para mensuração da perda óssea alveolar periodontal em ratos submetidos a estresse. **Arquivos em Odontologia**, v. 50, n. 4, p. 185-192, 2014.

GARLET, G. P. *et al.* The role of chemokines and cytokines in the pathogenesis of periodontal and periapical lesions: Current concepts. In: **Inflammation, Chronic**

Diseases and Cancer-Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Bases. IntechOpen, 2012.

GARTNER, L.; HIATT, J. Tratado de Histologia em Cores. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 1308 p. ISBN 978-85-352-2347-7.

GENCO, R. *et al.* A Proposed Model Linking Inflammation to Obesity, Diabetes, and Periodontal Infections. **Journal Of Periodontology**. v. 76, n. 11, p.2075-2084, nov. 2005. DOI: 10.1902 / jop.2005.76.11-S.2075. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16277579/>.

GHAFFARI, N. *et al.* The Effect of an Obesogenic Maternal Environment on Expression of Fetal Umbilical Cord Blood miRNA. **Reproductive Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 860-864, Jul. 2015. DOI 10.1177/1933719114565032. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4565475/>.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY. Incidência global, regional e nacional, prevalência e anos vividos com incapacidade para 328 doenças e lesões para 195 países, 1990-2016: uma análise sistemática para o Estudo Global de Carga de Doenças 2016. **Lanceta**, [s. l.], 2016. DOI 10.1016/S0140-6736(17)32154-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28919117/>.

GILLIES, A. R.; LIEBERT, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle & nerve**, v. 44, n. 3, p. 318-331, 2011. DOI:10.1002 / mus.22094. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21949456/>.

GRAVES, D. T. *et al.* Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. In: Periodontal Disease. **Karger Publishers**, 2012. p. 117-132. DOI: 10.1159 / 000329675. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22142960/>.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**. 2011;29:415-45. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21219177/>.

GUIMARÃES, E. *et al.* Altered behavior of adult obese rats by monosodium l-glutamate neonatal treatment is related to hypercorticosteronemia and activation of hypothalamic ERK1 and ERK2. **Nutritional neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 153-160, 2017. DOI 10.1179 / 1476830515Y.0000000004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25683673/>.

GUYTON, A.C; Hall J.E.Tratado de Fisiologia Médica. Editora Elsevier. 13ª ed., 2017.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 30, 2015. DOI: 10.1038 / nri3785. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4276050/>.

HASAN, A.; PALMER, R. A clinical guide to periodontology: pathology of periodontal disease. **BRITISH DENTAL JOURNAL**, [s. l.], v. 216, n. 8, p. 457-461, Apr. 2014.

DOI 10.1038/sj.bdj.2014.299. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24762896/>.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) Diabetes Mellitus: The Thrifty Phenotype Hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595- 601, 1992. DOI: 10.1007/BF00400248. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1644236/>.

HENNEMAN, S. *et al.* Local variations in turnover of periodontal collagen fibers in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 47, n. 3, p. 383–388, 2012. DOI: 10.1111 /j.1600-0765.2011.01444.x. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22126458/>.

HRUBY, A.; HU, F. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **Pharmacoeconomics**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 673-689, jul. 2015. DOI 10.1007/s40273-014-0243-x. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25471927/>.

JANG, H.; SERRA, C. Nutrition, Epigenetics, and Diseases. **Clinical nutrition research**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1-8, 27 jan. 2014. DOI 10.7762 / cnr.2014.3.1.1. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3921290/>.

LISTL, S.; GALLOWAY, J; GALLOWAY, P. Global Economic Impact of Dental Diseases. **Journal of Dental Research**, [s. l.], 2015. DOI <https://doi.org/10.1177/0022034515602879>. Disponível em:
<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034515602879>.

JUNG, U.; CHOI, M.S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 4, p. 6184–6223, 2014. DOI: 10.3390 / ijms15046184. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24733068/>.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. [S. l.], 558 pg. 2013.

KEMP, J. G. *et al.* Morphological and biochemical alterations of skeletal muscles from the genetically obese (ob/ob) mouse. **International journal of obesity**, v. 33, n.8, p. 831, 2009. DOI: 10.1038 / ijo.2009.100. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19528970/>.

KELLEY, D. E.; GOODPASTER, B. H. Triglicérido do músculo esquelético. Um aspecto da adiposidade regional e resistência à insulina. **Clinical Diabetology** , v. 2, n. 4, p. 255-266, 2001.

KIM, S.E. *et al.* A modified method for inducing periodontitis in dogs using a silk-wire twisted ligature. **Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 2, p. 193-197, 2012.

KLAUSEN B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **Journal of Periodontology**, v. 62, n. 1, p. 59-73, 1991.

KOLETZKO, B.; SYMONDS, M.; OLSEN, S. Programming research: where are we and where do we go from here?. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 94, n. 6, p. 2036-2043, dez. 2011. DOI 10.3945/ajcn.111.018903. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22089444/>. Acesso em: 15 jun. 2021.

KUHN, C. *et al.* Bariatric surgery induces morphological changes in the extensor digitorum longus muscle in the offspring of obese rats. **Elsevier Tissue and Cell**, [s. l.], v. 72, out. 2021. DOI 10.1016/j.tice.2021.101537. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0040816621000537>. Acesso em: 18 out. 2021.

LEGUISAMO, N.M. *et al.* GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. **Cardiovascular Diabetology**, [s. l.], Ago. 2012. Disponível em: <https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2840-11-100>.

LEITE, M. A. *et al.* Experimental periodontitis in the potentialization of the effects of immobilism in the skeletal striated muscle. **Inflammation**, v. 40, n. 6, p.2000-2011, 2017. DOI: 10.1007 / s10753-017-0640-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28822015/>.

LENT, R. **Cem Bihões de Neurônios?** Conceitos Fundamentais de Neurociência. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010. 740 p.

LEOCÁDIO, P. L. *et al.* The Transition From Undernutrition to Overnutrition Under Adverse Environments and Poverty: The Risk for Chronic Diseases. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], Apr. 2021. DOI 10.3389/fnut.2021.676044. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33968973/>.

LISTGARTEN, M. A. Similarity of epithelial relationship in the gingiva of rat and man. **Journal of Periodontology**, v. 46, n. 11, p. 677-680, 1975.

LIMA, V, BEZERRA, M.M, LEITÃO, FRC, *et al.* Main inflammatory mediators involved in the physiopathology of periodontitis – role of pharmacological modulators. **Revista Periodontia**. 2008; 18-3: 7-19. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-587894>.

LINDHE J., LANG N. P., KARRING T. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1304, 2010.

LINDHE, J.; LANG, N. P. **Clinical Periodontology and Implant Dentistry**. Chichester, John Wiley & Sons, 2015.

LINDEN, G. *et al.* Obesity and periodontitis in 60–70-year-old men. **Journal of clinical periodontology**, v. 34, n. 6, p. 461-466, 2007. DOI: 10.1111 / j.1600-051X.2007.01075.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17403015/>.

LIRA-JUNIOR, R.; FIGUEREDO, C. Periodontal and inflammatory bowel diseases: Is there evidence of complex pathogenic interactions?. **World Journal**

Gastroenterology, [s. l.], v. 22, n. 35, p. 7963-7972, Sep. 2016. DOI 10.3748/wjg.v22.i35.7963. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27672291/>.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, 156: 38–50; discussion 50–35, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1855415/>.

MARCINIAK, A. *et al.* Fetal programming of the metabolic syndrome. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 133-138, abril 2017. DOI 10.1016 / j.tjog.2017.01.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28420495/>.

MARINHO, R. *et al.* Influência da intensidade do programa de treinamento físico sobre a fosforilação da proteína AKT em músculo esquelético e sensibilidade à insulina de ratos obesos. **Revista de Educação Física**, v. 26, n. 1, pág. 107-117, 20 de abril de 2015. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevEducFis/article/view/23718>

MARSEGLIA, L. *et al.* Obesity and breastfeeding: The strength of association. **Int J Mol Sci**. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25548896/>

MATTERA, M. *et al.* Effect of maternal periodontitis on GLUT4 and inflammatory pathway in adult offspring. **Journal of Periodontology**, [s. l.], 2019. DOI 10.1002/JPER.18-0568. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30729535/>.

MOURA-GREC, P. G. *et al.* Obesity and periodontitis: systematic review and meta-analysis. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.1763-1772, jun. 2014. DOI: 10.1590 / 1413-81232014196.13482013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24897477/>.

MONTEIRO, D. A. *et al.* Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 141–149, 2006.

NAGARAJAN, P. *et al.* Genetically modified mouse models for the study of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal Of Gastroenterology**, v.18, n.11, p.1141-1153, 2012.

NASSAR, P. O., *et al.* Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of periodontal research**, v. 44, n. 4, p. 479-488, 2009.

NASCIMENTO, A.F. *et al.* A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in *Wistar* rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 968-974, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000600007>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/4KF8p3BhXNcV5nvGKSJnkjR/?lang=en>.

OLIVEIRA, R.A.R. *et al.* Prevalence of 41 obesity and association of body mass index with risk factors in public school teachers. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 17, n. 6, p. 742-752, 2015.

OLNEY, J. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, [s. l.], v. 164, n. 3880, p. 719-721, 9 maio 1969. DOI 10.1126 / science.164.3880.719. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5778021/>.

ORNOY, A. Prenatal origin of obesity and their complications: Gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia. **Reproductive toxicology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 205-212, 2011. DOI 10.1016/j.reprotox.2011.05.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21620955/>.

OTOMO-CORGEL, J. *et al.* State of the science: chronic periodontitis and systemic health. **Journal of Evidence Based Dental Practice**, v. 12, n. 3, p. 20-28, 2012. DOI: 10.1016 / S1532-3382 (12) 70006-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23040337/>.

PASTORE, A. *et al.* Efeito da associação entre obesidade neuroendócrina e exócrina experimental sobre a pressão arterial de cauda e o metabolismo de glicose de ratos Wistar. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, [s. l.], v. 32, n. 2, jun. 2010. DOI <https://doi.org/10.1590/S0101-28002010000200008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbn/a/PJ8btrqk4zgDnsvxHNtGTnN/?lang=pt>.

PETERSEN, P.; OGAWA, H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. **Periodontology 2000**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 15-39, out. 2012. DOI 10.1111/j.1600-0757.2011.00425.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22909104/>.

PERVANIDOU P.; CHROUSOS G.P. Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. **Metabolism**. 2012;61(5):611-9. DOI 10.1016/j.metabol.2011.10.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22146091/>.

PIMENTEL, G. D. *et al.* The role of neuronal AMPK as a mediator of nutritional regulation of food intake and energy homeostasis. **Metabolism**, v. 62, n. 2, p. 171-178, 2013. DOI: 10.1016 / j.metabol.2012.07.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22898253/>.

PIHLSTROM, B.L, MICHALOWICZ, B.S, JOHNSON, NW. Periodontal diseases. **Lancet**. 2005; 366-9499:1809-1820. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16298220/>.

QUINES, C. B. *et al.* (p-CIPhSe) 2 stabilizes metabolic function in a rat model of neuroendocrine obesity induced by monosodium glutamate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 168-180, 2018. DOI: 10.1016 / j.fct.2018.05.010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29738801/>.

- REYS, T.; SAWCHENKO, P. Involvement of the arcuate nucleus of the hypothalamus in interleukin-1-induced anorexia. **Journal of neuroscience**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 5091-5099, 15 jun. 2002. DOI: 10.1523 / JNEUROSCI.22-12-05091.2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12077204/>.
- RODINI, C. O. Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura: caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (inos) e metaloproteinases-2 e-9. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. 2005. DOI: 10.11606/D.25.2005.tde-15082005-143545.
- SALAM, R.; BHUTTA, J. Impact of intrauterine growth restriction on long-term health. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 249-254, maio 2014. DOI: 10.1097/MCO.000000000000051. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24613859/>.
- SALLAY, K. *et al.* Bacterial invasion of oral tissues of immunosuppressed rats. **Infect Immun**, v. 43, n. 3, p. 1091-1093, 1984.
- SALES-PERES, S. H. C. *et al.* Alveolar bone pattern and salivary leptin levels among premenopausal obese women. ABCD. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva** (São Paulo), v. 32, n. 1, 2019. DOI: 10.1590/0102-672020180001e1422. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abcd/a/hFmxMb5sLKwZphDfkCc3g6G/?lang=en>.
- SISHI, B. *et al.* Diet-induced obesity alters signalling pathways and induces atrophy and apoptosis in skeletal muscle in a prediabetic rat model. **Exp. Physiol.**, v. 96, p. 179-193, 2010. Disponível em: <http://ep.physoc.org/content/96/2/179.long>.
- SILVA, M. D. P.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 21-31, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S151635982007001000003>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/XVFK7hzDF8V4fKS5fwgqB3M/abstract/?lang=pt>.
- SILVENNOINEN, M. *et al.* High-fat feeding induces angiogenesis in skeletal muscle and activates angiogenic pathways in capillaries. **Angiogenesis**, v. 16, n. 2, p. 297-307, 2013. DOI: 10.1007 / s10456-012-9315-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23090645/>.
- SILVEIRA, P. P.; PORTELLA, A. K.; GOLDANI, M. Z.; BARBIERI, M. A. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **Jornal de Pediatria**, 83(6):494-504, 2007. DOI: 10.2223/JPED.1728. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jped/a/8yYgch9mB4pDhRBsRJJMHdW/?format=pdf&lang=pt>.
- SŁOTWIŃSKA, S.M, SŁOTWIŃSKI, R. Host response, obesity, and oral health. **Cent Eur J Immunol**.40(2):201-5, 2015. DOI: 10.5114/ceji.2015.52834. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26557035/>

STRAUB, R. H.; CUTOLO, M. Glucocorticoids and chronic inflammation. **Rheumatology**, v. 55, n. suppl_2, p. ii6-ii14, 2016. DOI: 10.1093 / rheumatology/kew348. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27856655/>.

SUVAN, J. E. *et al.* Association between overweight/obesity and increased risk of periodontitis. **Journal of clinical periodontology**, v. 42, n. 8, p. 733-739, 2015. DOI: 10.1111 / jcpe.12421. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26059115/>.

TAMURA, H.; *et. al.* Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. **Endocrinology**, v. 143, n. 9, p. 3268–3275, 2015. DOI: 10.1210 / en.2002-220268. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12193538/>.

TROTTER, J.; PURSLOW, P. Functional morphology of the endomysium in series fibered muscles. **Journal of morphology**, [s. l.], v. 212, n. 2, p. 109-122, may. 1992. DOI 10.1002/jmor.1052120203. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1608046/>.

URRUTIA-PEREIRA, M.; SOLÉ, D. Deficiência de vitamina D na gravidez e o seu impacto sobre o feto, o recém-nascido e na infância. **Revista Paulista de Pediatria**, [s. l.], v. 33, n. 1, jan./mar. 2015. DOI: 10.1016/j.rpped.2014.05.004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rpp/a/zgjCh7Ld7ZdzFDdBFcv7DpH/?lang=pt>.

WARD, S.S.; STICKLAND, N.C. Why are slow and fast muscles differentially affected during prenatal undernutrition? **Muscle Nerve**, v. 14, n.3, p. 259-267, 1991.

World Health Organization (2018). **Obesity**. Disponível em: <https://www.who.int/topics/obesity/en/> Acesso em 20 de abril de 2019.

WU, H.; XIONG, W. C.; MEI, L. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. **Development**, v. 137, n. 7, p. 1017-1033, 2010. DOI: 10.1242 / dev.038711. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20215342/>.

ANEXO A - PARECER DO CÔMITE DE ÉTICA



Autorização

O protocolo intitulado "Influência da obesidade-MSG e doença periodontal materna sobre a massa óssea mandibular da prole na vida adulta", sob a responsabilidade de **Sandra Lucinei Balbo** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 08/12/2017.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/02/2017 - 02/02/2020
Espécie/inhagem/raça	Rato heterogêneo: <i>Rattus norvegicus</i> Wistar
N. de animais	20
Peso/idade	100-200g/70 dias
Sexo	Feminino
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE - campus Cascavel - PR.

Cascavel, 11/12/2017

Prof. Dra. **Luana Oliveira de Fariña**
 Coordenadora do CEUA
 Portaria nº 3730/2016 - GRE

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA

1 Diretrizes para Autores

Diretrizes para Autores

O *International Journal of Experimental Pathology* (anteriormente *British Journal of Experimental Pathology*) é publicado continuamente desde 1920. É publicado apenas em formato online desde janeiro de 2014.

1. Objetivos e Escopo

A Patologia Experimental abrange o uso de técnicas científicas multidisciplinares para investigar a patogênese e progressão de processos patológicos.

O *International Journal of Experimental Pathology - IJEP* – tem como objetivo publicar artigos de alta qualidade que proporcionem insights novos e imaginativos sobre a Patologia Experimental, ajudando assim a elucidar ainda mais os mecanismos subjacentes às doenças. Fundado em 1920 pelo falecido Paul Fildes (como *British Journal of Experimental Pathology*), o *IJEP* contribuiu com vários avanços importantes para a literatura da ciência biomédica, desde a observação original da penicilina: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2566493/> para o primeiro relatório do modelo animal do vírus Ebola: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7547435> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1997188/>

Para continuar a atingir este objetivo, o *IJEP* considera para publicação artigos em um amplo espectro de abordagens investigativas. Isto pode ser na forma de estudos *in vitro*, modelos animais e pesquisas clínicas. Os principais objetivos são (i) relatar trabalhos que abordem o tema comum do mecanismo em nível celular e molecular; e (ii) interpretar este trabalho tanto como um relatório científico acadêmico *em si*, como num contexto traducional.

Assim, o *IJEP* proporciona um fórum para publicação sobre patologia e etiologia de doenças humanas e veterinárias, processos inflamatórios agudos e crônicos (infecciosos e não infecciosos), lesões toxicológicas e traumáticas, doenças degenerativas e iatrogênicas, fibrose e cancro.

Existem três formas de publicação do *IJEP*: (i) artigos de pesquisa originais que relatam diretamente investigações experimentais; (ii) artigos de revisão (tanto contribuídos como encomendados) e (iii) cartas ao Editor sobre temas que foram abordados na Revista, às quais os autores são convidados a responder.

No que diz respeito aos artigos originais, baseados nas metas e objetivos descritos acima, o *IJEP* reconhece que uma ampla gama de métodos pode precisar ser incorporada ao texto. A ênfase está em investigações baseadas em hipóteses, em vez de relatos de casos e estudos descritivos.

Há uma longa tradição do *IJEP* na publicação de artigos de revisão. Às vezes, eles se concentram em temas individuais. Por exemplo, o artigo de revisão mais “longo” do *IJEP* explorou modelos animais de esteatohepatite: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x/abstract> e outra revisão recente analisou os modelos moleculares importantes no estudo da distrofia muscular. Outros são publicados em série: os temas incluem angiogênese, modelos experimentais de doenças renais e biologia e patologia de tendões.

O *IJEP* tem tradicionalmente se interessado pelo microambiente do tecido conjuntivo – sua estrutura e sua relação com os processos dinâmicos, muitas vezes crônicos, que ocorrem dentro dele, bem como pela patologia dos próprios tecidos. A relação entre o local do tecido, célula e matriz, inflamação e cicatrização, tem sido explorada em muitos locais diferentes, particularmente no pulmão e na articulação sinovial. Além disso, o *IJEP* patrocina e publica a série de palestras do Prêmio Fell Muir nesta área, organizada pela Sociedade Britânica de Biologia Matrix.

O *IJEP* presta especial atenção para que as pesquisas relatadas estejam em conformidade com os padrões éticos atualmente aceitos; que sejam declarados conflitos de interesse; e que as fontes de financiamento e outras formas de assistência sejam reconhecidas. Mais detalhes sobre como esses aspectos devem ser abordados são discutidos abaixo.

2. Requisitos de língua inglesa

O *IJEP* não pode realizar correções de linguagem, que são de responsabilidade do autor. Os artigos serão cancelados imediatamente da Revista se o artigo não atender a esses critérios. Os artigos devem ser escritos em inglês claro e conciso. A ortografia deve seguir o *The Concise Oxford Dictionary of Current English*. Evite jargões e neologismos. Quando o inglês não for a primeira língua dos autores, o artigo deverá ser verificado por um falante nativo de inglês.

Suporte para preparação de artigos

[Wiley Editing Services](#) oferece ajuda especializada com edição em inglês, bem como tradução, formatação de manuscritos, ilustração de figuras, formatação de figuras e design gráfico abstrato – para que você possa enviar seu manuscrito com confiança.

Além disso, verifique nossos recursos para [Preparando seu artigo](#) para obter orientações gerais sobre como escrever e preparar seu manuscrito.

3. Ética e Política de Publicação

3.1 Política Ética

O *IJEP* presta especial atenção para que as pesquisas relatadas estejam em conformidade com os padrões éticos.

As informações sobre diversas questões relacionadas à Ética em Publicações são tratadas nas seções relevantes abaixo, mas são descritas na íntegra em um documento separado, [Políticas Éticas do International Journal of Experimental Pathology](#).

Estas políticas éticas baseiam-se nas [Diretrizes de Melhores Práticas sobre Ética em Publicações: a Perspectiva de um Editor](#), 2ª ed. da Wiley, e no [Código de Conduta COPE e Diretrizes de Melhores Práticas para Editores de Revistas](#).

O *IJEP* é membro do [Comitê de Ética em Publicações \(COPE\)](#). Os princípios do COPE são que a submissão é considerada desde que os artigos sejam previamente inéditos e não sejam oferecidos simultaneamente em outro lugar; que todos os autores (definidos abaixo) leram e aprovaram o conteúdo; que todos os autores divulgaram conflitos de interesses financeiros e outros; e que o trabalho está em conformidade com as políticas éticas da Revista, tendo sido conduzido sob padrões éticos internacionalmente aceitos, após revisão ética relevante por uma autoridade ética designada.

3.2 Estudos em Animais

Os manuscritos que descrevem estudos envolvendo animais devem cumprir as diretrizes locais/nacionais que regem o uso de animais experimentais e devem conter uma declaração indicando que os procedimentos foram aprovados pelo órgão regulador apropriado.

3.3 Estudos Humanos

Os manuscritos relativos a estudos em humanos devem conter declarações indicando que foi obtido consentimento informado por escrito, que os estudos foram realizados de acordo com a [Declaração de Helsink i](#) e que os procedimentos foram aprovados por um comitê de ética local. Se indivíduos puderem ser identificados a partir de uma publicação (por exemplo, a partir de imagens), os autores deverão obter o consentimento explícito dos indivíduos.

3.4 Declarações de Conflitos de Interesse(s)

Conflitos de interesse (s) – incluindo declaração nula – são uma seção obrigatória nos artigos publicados na Revista.

Todos os autores devem incluir detalhes completos de quaisquer conflitos de interesse na seção Conflitos de Interesse. Os autores são obrigados a divulgar **interesses financeiros** (por exemplo, emprego, participação acionária significativa, direitos de patente, consultoria, financiamento de pesquisa, etc.) em qualquer empresa ou instituição que possa se beneficiar de sua publicação. Todos os autores devem fornecer detalhes de **quaisquer outros potenciais interesses concorrentes de natureza pessoal que os leitores ou editores possam considerar relevantes para a sua publicação**.

Além desta seção no próprio manuscrito, após aceitação para publicação, todos os autores devem fornecer detalhes completos de quaisquer conflitos de interesse, enviando-os por e-mail para a assistente editorial da revista, Biljana Nikolic b.nikolic@ucl.ac.uk .

Observe que os revisores também são obrigados a fornecer informações sobre quaisquer conflitos de interesse.

Detalhes mais completos sobre a natureza dessas declarações estão nas [Políticas Éticas do International Journal of Experimental Pathology](#) .

3.5 Declaração de Financiamento

Todos os artigos devem incluir uma seção de Declaração de Financiamento, onde a divulgação das fontes de financiamento é incluída em uma seção separada dentro do artigo.

Todas as **fontes de financiamento devem ser divulgadas**. Isto inclui fontes governamentais, industriais, de caridade, filantrópicas e/ou pessoais. A questão principal é a transparência sobre como os estudos descritos no manuscrito foram financiados. Quando apropriado, o financiamento deve ser atribuído ao(s) autor(es) relevante(s).

Exemplos:

Este estudo foi financiado por uma bolsa de projeto do Conselho Nacional de Saúde e Pesquisa Médica da Austrália (DN-P, FM) e uma bolsa de pesquisa sênior do Conselho Nacional de Saúde e Pesquisa Médica da Austrália (DN-P).

Este artigo foi financiado por uma bolsa da agência brasileira CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento, Procs. Nr. 301596/2011-5; 475148/2012-6) e FAPEG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Goiás, Procs Nr. 05/2012) .

Este trabalho foi apoiado pela Uehara Memorial Foundation, Tóquio, Japão e por Grants-in-Aid for Scientific Research (23390480 e 23792512) do Ministério da Educação, Cultura, Esportes, Ciência e Tecnologia, Tóquio, Japão.

3.6 Agradecimentos

Todos os trabalhos devem incluir uma seção de Agradecimentos onde todos os agradecimentos são agrupados. A seção de Agradecimentos pode incluir comentários reconhecendo contribuições do manuscrito que não fazem parte da autoria, mas que ainda assim são úteis. Por exemplo, o bem-estar animal, a língua, a orientação científica, a assistência estatística e técnica podem ser registados nesta secção. Os autores devem agradecer aqueles que fizeram contribuições substanciais para o estudo ou preparação do manuscrito, mas cujas contribuições não atendem aos requisitos de autoria – veja abaixo.

3.7 Autoria

Todos os autores devem cumprir os três critérios a seguir:

- Contribuições substanciais para o desenho da pesquisa, ou para a aquisição, análise ou interpretação dos dados,
- Redação do manuscrito ou revisão crítica do mesmo, e
- Aprovação das versões submetida e final.

4. Processo de submissão e revisão de manuscritos

4.1 O Processo de Revisão

Todos os manuscritos submetidos estão sujeitos à revisão por revisores experientes, e as opiniões dos revisores e do Conselho Editorial são consideradas pelo Editor. Os autores poderão sugerir os nomes dos revisores adequados em uma carta de apresentação ou por meio do site, se assim desejarem. O Editor seleciona e aceita manuscritos adequados para publicação – a decisão do Editor é final. Os manuscritos aceitos para publicação são editados e digitados. As provas são enviadas ao Autor Correspondente para verificação final, mas alterações extensas nas provas poderão ser cobradas dos colaboradores.

4.2 Condições de Aceitação

Os manuscritos são aceitos sob a condição de que nenhuma parte substancial foi ou será publicada em outro lugar. Todos os manuscritos submetidos serão examinados para possíveis sobreposições e duplicações com trabalhos já publicados. Os manuscritos podem estar sujeitos a revisão editorial sem aviso prévio e permanecem sob os direitos autorais da Revista. Caso um manuscrito devolvido aos autores para revisão não seja recebido de volta à redação após 90 dias, será tratado como uma nova submissão. O Editor reserva-se o direito de tomar a decisão final sobre a aceitação ou não do manuscrito.

O autor que submete um manuscrito para publicação é responsável por garantir que todos os demais autores concordem com sua submissão. Todos os manuscritos devem ser acompanhados de uma carta de apresentação aprovada e assinada pelo Autor Correspondente em nome de todos os autores. As pessoas mencionadas nos agradecimentos e os responsáveis por quaisquer comunicações pessoais deverão ter concordado formalmente com a aparição dos seus nomes.

4.3 Envio On-line

Novas submissões deverão ser feitas através do portal de submissões [do Research Exchange](#). Você pode verificar o status do seu envio a qualquer momento fazendo login em [submit.wiley.com](#) e clicando no botão “Meus envios”. Para obter ajuda técnica com o

sistema de envio, consulte nossas [perguntas frequentes](#) ou entre em contato com submithelp@wiley.com

Para submeter os autores será necessário um ID de usuário e senha, que podem ser obtidos na primeira utilização do site de submissão. Instruções completas são fornecidas ao acessar o site. Todos os tipos de arquivos são suportados, mas para ajudar o Editor e os revisores a visualizar a submissão, os seguintes tipos são recomendados:

Texto: Microsoft Word (.doc ou .docx) ou formato rich text genérico (RTF).

Para detalhes sobre formatos para submissão de Tabelas e Figuras, consulte a seção Tabelas e Figuras: 7. Formato do Manuscrito.

É fortemente recomendado que, sempre que possível, os autores combinem todas as partes da sua submissão num único documento. Alternativamente, os autores podem submeter o texto do manuscrito (incluindo página inicial, resumo, corpo do texto, referências e legendas de tabelas e figuras) como um documento, com tabelas e figuras em um arquivo separado.

5. Acesso aberto

O acesso aberto está disponível para autores de artigos de pesquisa primária que desejam disponibilizar seus artigos para não assinantes no momento da publicação, ou cuja agência financiadora exige que os bolsistas arquivem a versão final de seu artigo. Com acesso aberto, o autor, a agência financiadora do autor ou a instituição do autor paga uma taxa (APC) para garantir que o artigo seja disponibilizado para não assinantes no momento da publicação através da Wiley Online Library, bem como depositado no local preferencial da agência financiadora. Para obter mais informações sobre taxas de publicação de artigos, visite a [página de acesso aberto](#).

Para visualizar os termos e condições desses acordos de acesso aberto, visite as Perguntas frequentes sobre direitos autorais hospedadas no Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp e visite <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>. Todos os artigos de acesso aberto são tratados da mesma forma que qualquer outro artigo. Eles passam pelo processo padrão de revisão por pares da Revista e serão aceitos ou rejeitados com base em seu próprio mérito.

6. Direitos autorais

Quando os manuscritos forem aceitos, os autores identificados como Autor Correspondente formal do manuscrito receberão um e-mail solicitando que façam login no Author Services; onde, por meio do Wiley Author Licensing Service (WALS), eles poderão concluir o contrato de licença em nome de todos os autores do manuscrito.

Para autores que assinam o acordo de transferência de direitos autorais

Caso a opção de acesso aberto não seja selecionada, será apresentado ao Autor Correspondente o contrato de transferência de direitos autorais (CTA) para assinar. Os termos e condições do CTA podem ser visualizados nos exemplos associados às Perguntas frequentes sobre direitos autorais abaixo:

Termos e Condições do CTA http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

Para autores que escolhem acesso aberto

Se a opção de acesso aberto for selecionada, o Autor Correspondente poderá escolher entre os seguintes Contratos de Acesso Aberto de Licença Creative Commons (OAA):

- Licença Creative Commons Atribuição OAA
- Licença Creative Commons Atribuição Não Comercial OAA
- Creative Commons Atribuição Não Comercial -Licença Sem Derivados OAA

Para visualizar os termos e condições desses acordos de acesso aberto, visite as Perguntas frequentes sobre direitos autorais hospedadas no Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp e visite <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright-License.html> . Consulte a seção Acesso aberto abaixo para obter mais informações.

Se a opção de acesso aberto for selecionada e a pesquisa for financiada pelo The Wellcome Trust e membros do Research Councils UK (RCUK), o autor correspondente terá a oportunidade de publicar o artigo sob uma licença CC-BY para cumprir com o The Requisitos do Wellcome Trust and Research Councils do Reino Unido. Para obter mais informações sobre esta política e a política de autoarquivamento compatível da revista, visite: <http://www.wiley.com/go/funderstatement> .

7. Formato do Manuscrito

Os manuscritos devem ser salvos para submissão em espaço duplo.

A data de submissão utilizada será a data de submissão da versão em texto eletrônico. Os autores são aconselhados a manter uma cópia de todos os manuscritos, pois nenhuma responsabilidade pode ser aceita por perda.

O texto deverá seguir o seguinte formato:

Primeira página:

Uma única 'página inicial' deve conter: (1) o título do manuscrito; (2) um título curto (não superior a 40 caracteres); (3) o(s) nome(s) do(s) autor(es), incluindo nome próprio e sobrenome; (4) o(s) departamento(s) em que o trabalho foi realizado; e (5) nome, endereço postal completo, número de fax e e-mail do autor para quem deverão ser enviadas as provas e solicitações de separatas, sob o título 'Correspondência'. O Autor Correspondente deverá assumir a responsabilidade de comunicar com todos os outros autores e obter a sua aprovação para a versão final a ser publicada. Durante a submissão on-line, os Autores Correspondentes podem nomear uma pessoa, que pode ou não ser autor, para auxiliá-los na administração do processo de publicação.

O Autor Correspondente deve confirmar que todos os autores listados atendem aos critérios de autoria [do ICMJE](#) e que ninguém que se qualifique para autoria foi excluído. Consulte a Seção 3.5 Autoria.

Segunda página:

A segunda página deverá conter um parágrafo de resumo que deverá fornecer um relato factual do contexto em que o estudo foi realizado, o(s) objetivo(s), métodos e resultados, e uma breve conclusão, em não mais de 250 palavras. Para fins de revisão e indexação, deverão ser identificadas até seis 'palavras-chave' relacionadas aos assuntos discutidos no artigo e incluídas no rodapé do resumo.

Artigos de pesquisa originais

Os relatórios de trabalhos originais geralmente devem ser organizados na ordem convencional de introdução, métodos, resultados, discussão, agradecimentos e referências, com títulos adequados para cada parte. Podem ser utilizadas outras subdivisões, com títulos apropriadamente menos significativos. Os resultados podem ser apresentados no texto, em tabelas e figuras, mas o texto deve, em geral, comentar e não repetir informações em tabelas.

Artigos de revisão

Os artigos de revisão geralmente serão encomendados, mas a Revista também aceita submissões que não tenham sido solicitadas. Para revisões não solicitadas, os autores são aconselhados a consultar o Editor com antecedência. Uma vez que o Editor tenha concordado em considerar um artigo de revisão, as diretrizes para submissão on-line são as mesmas que para um artigo de pesquisa original.

Cartas para o editor

A correspondência relativa a artigos publicados recentemente na Revista poderá ser publicada. O Editor reserva-se o direito de solicitar uma resposta dos autores originais para publicação conjunta. As cartas devem ser tão curtas quanto possível (mas não mais que 1000 palavras de texto, duas figuras ou tabelas ou uma de cada, e até 10 referências). A correspondência para a Revista é aceita no entendimento de que o autor colaborador licencia o editor para publicar a carta como parte da Revista ou separadamente dela, no exercício de quaisquer direitos subsidiários relativos à Revista e seu conteúdo.

Tabelas e Figuras

Cada legenda de tabela/figura deverá ser apresentada juntamente com sua tabela/figura. As figuras/tabelas deverão ser inseridas dentro do texto nos locais apropriados ou agrupadas no final.

Para submissão on-line, as ilustrações devem ser incorporadas ao documento Word ou carregadas como arquivos separados. A qualidade deve ser suficiente para visualização na tela e impressão em desktop.

Sempre que possível, forneça arquivos de arte digital de alta qualidade.

Figuras: JPEG, GIF, EPS, PNG Microsoft PowerPoint, Microsoft Excel, Microsoft Word são aceitáveis.

Imagens digitais: As versões digitais das figuras deverão ser fornecidas em formato TIFF.

Tanto as tabelas quanto as figuras deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos. Cada um deve ter uma legenda descritiva separada. As chaves devem ser fornecidas nas legendas e não na figura em si. Todas as ilustrações, tanto desenhos quanto fotografias, devem ser de boa qualidade, pois poderão ocorrer atrasos se os revisores precisarem ver versões melhoradas. A título de orientação, a resolução/especificação de figura ideal para vários tipos de figuras originais, em seu tamanho final, é a seguinte:

Arte de linha e diagramas - Mínimo de 600 dpi

Meio-tom (fotografias em preto e branco e coloridas) - Mínimo de 300 dpi

Linha e tom (arte de linha e meio-tom combinados) - Mínimo de 600 dpi

É melhor usar o software Illustrator ou Photoshop e salvar o material no formato '.eps' ou '.tif'. Se o autor não puder fornecer esses formatos, salve as figuras em tantos formatos de arquivo

diferentes quanto possível. Para obter mais informações sobre formatos de arquivo, consulte as instruções em <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>

Ilustrações coloridas

O *IJEP* é publicado apenas online e não há cobrança pela inclusão de figuras coloridas.

Informações de Apoio

Os autores podem fornecer texto ou dados adicionais como “Arquivos de Informações de Apoio”, mas o manuscrito principal deve conter informações suficientes para tornar o trabalho inteligível sem esses arquivos. As informações de apoio são uma parte formal do manuscrito publicado e normalmente não devem ser republicadas em outro lugar.

Nossos tipos de arquivo recomendados para informações de suporte são: .doc/ .xls/ .ppt/ .txt/ .jpg/ .jpeg/ .gif/ .tif/ .tiff/ .png/ .bmp/ .eps/ .ps/ .html / .pdf/ .mov/ .mpg/ .wav/ .mp3/ .wma

Observe que as informações de apoio não são subeditadas ou revisadas, portanto, os autores devem garantir que os arquivos sejam fornecidos prontos para publicação on-line. Os tamanhos dos arquivos devem ser os menores possíveis, para que possam ser baixados rapidamente e não devem exceder 50 MB.

Medidas

As medições devem ser expressas em unidades SI. Se as observações originais foram registradas noutras unidades, isso deverá ser indicado, juntamente com os factores de conversão apropriados.

Abreviações padrão

Devem ser utilizadas abreviaturas padrão e seguir as estabelecidas em Unidades, Símbolos e Abreviaturas (1994) publicado pela Royal Society of Medicine. As abreviaturas devem ser usadas com moderação e somente se um nome ou expressão longa for repetida com frequência ao longo do manuscrito. As palavras devem aparecer por extenso na primeira aparição no resumo e no texto, seguidas da abreviatura entre parênteses. Os medicamentos devem ser descritos pelos seus nomes oficiais, mas os nomes comerciais devem ser indicados entre parênteses na primeira vez que o medicamento for citado no texto.

Reconhecimentos

Os autores são obrigados a incluir detalhes de aprovação ética, divulgação de conflitos de interesse financeiros e outros e fontes de financiamento.

Referências

Todas as referências devem ser numeradas consecutivamente por ordem de aparecimento e devem ser tão completas quanto possível. Nas citações de texto, as referências devem ser citadas em ordem consecutiva, usando algarismos arábicos sobrescritos. Seguem exemplos de referências:

Artigo de periódico:

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Aspectos numéricos das projeções pontina, reticular lateral e olivar inferior para duas zonas corticais paravermis do cerebelo do gato. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Livro:

2. Voet D, Voet JG. Bioquímica. Nova York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 pág.

Observe que as abreviações dos títulos dos periódicos devem estar em conformidade com as práticas do Chemical Abstracts. Para obter mais informações sobre o estilo de referência AMA - [Manual de Estilo AMA](#).

Qualquer artigo que esteja no prelo, mas sem DOI, não será considerado uma citação de referência válida e não poderá ser citado.

Otimização de mecanismos de pesquisa

Muitos estudantes e pesquisadores que procuram informações on-line usarão mecanismos de busca como Google, Yahoo ou similares. Ao [otimizar seus artigos para mecanismos de busca](#), os autores aumentarão a chance de alguém encontrar seu trabalho publicado. Isso, por sua vez, aumentará a probabilidade de seus artigos serem vistos e/ou citados em outro trabalho.

Consulte a [folha de dicas](#) para otimizar a descoberta de artigos e promovê-los após a publicação, e a [postagem do blog Wiley Exchanges](#) para obter conselhos sobre como escolher palavras-chave para artigos.

Permissões

Materiais copiados de outras fontes devem ser acompanhados de uma declaração por escrito do autor e do editor dando permissão ao *International Journal of Experimental Pathology* para reprodução. Os autores são responsáveis por obter permissão por escrito de pelo menos um autor para os artigos citados ainda no prelo, bem como para dados não publicados e para comunicações pessoais. É responsabilidade do autor garantir que as permissões sejam obtidas.

Nosso [guia](#) útil tornará seu artigo mais detectável com o **Search Engine Optimization**.

8. Provas de página

As provas serão enviadas eletronicamente por e-mail como um arquivo Acrobat PDF. O servidor de e-mail deve ser capaz de aceitar anexos de até 4 MB. Será necessário o Acrobat Reader para ler este arquivo. Este software pode ser baixado (gratuito) no seguinte site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html

Isso permitirá que o arquivo seja aberto, lido e corrigido na tela. Demais instruções serão enviadas junto com o comprovante. As provas serão publicadas se nenhum endereço de e-mail estiver disponível. Na ausência do Autor Correspondente, favor providenciar que um colega acesse este e-mail para recuperar as provas.

9. Pré-impressões

Esta revista considerará para revisão artigos previamente disponíveis como preprints em servidores não comerciais como ArXiv, bioRxiv, psyArXiv, SocArXiv, engrXiv, etc. Os autores também poderão publicar a versão submetida de seu manuscrito em servidores não comerciais a qualquer momento. Solicita-se aos autores que atualizem quaisquer versões de pré-publicação com um link para o artigo final publicado.

10. Visualização antecipada

O *Jornal Internacional de Patologia Experimental* é coberto pelo serviço Early View da Wiley-Blackwell. Os artigos Early View são artigos completos de texto completo publicados on-line antes de sua publicação em uma edição impressa. Os artigos ficam, portanto, disponíveis assim que ficam prontos, em vez de ter que esperar pela próxima edição agendada. Os artigos do Early View estão completos e finais. Eles foram totalmente revisados, revisados e editados para publicação, e as correções finais dos autores foram incorporadas. Por estarem em formato final, nenhuma alteração poderá ser feita após a publicação on-line. A natureza dos artigos do Early View significa que eles ainda não possuem número de volume, número ou página, portanto os artigos do Early View não podem ser citados da forma tradicional. Eles recebem, portanto, um Identificador de Objeto Digital (DOI), que permite que o artigo seja citado e rastreado antes de ser alocado a uma edição.

11. Dados e citação de dados

O *International Journal of Experimental Pathology* incentiva os autores a compartilhar os dados e outros artefatos que apoiam os resultados do artigo, arquivando-os em um repositório público apropriado. Os autores devem incluir uma declaração de acessibilidade dos dados, incluindo um link para o repositório que utilizaram, para que esta declaração possa ser publicada juntamente com o seu artigo.

12. Apoio à promoção de artigos

[Wiley Editing Services](#) oferece serviços profissionais de vídeo, design e redação para criar resumos de vídeo compartilháveis, infográficos, pôsteres de conferências, resumos leigos e notícias de pesquisa para sua pesquisa - para que você possa ajudar sua pesquisa a receber a atenção que merece.

13. Serviços do autor

O rastreamento de produção on-line agora está disponível através dos Serviços de Autor da Wiley-Blackwell. O Author Services permite que os autores acompanhem seus artigos - uma vez aceitos - desde o processo de produção até a publicação on-line. Os autores podem verificar o status de seus artigos on-line e optar por receber e-mails automatizados nas principais etapas da produção, para que não precisem entrar em contato com o editor de produção para verificar o progresso. Visite authorservices.wiley.com/bauthor para obter mais detalhes sobre rastreamento de produção on-line e uma variedade de recursos, incluindo perguntas frequentes e dicas sobre preparação, envio de artigos e muito mais.