

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

MARCELA APARECIDA LEITE

**PERIODONTITE EXPERIMENTAL COMO FATOR DE RISCO NA
POTENCIALIZAÇÃO DOS EFEITOS DO IMOBILISMO**

CASCADEL – PR
Janeiro/2017

MARCELA APARECIDA LEITE

**PERIODONTITE EXPERIMENTAL COMO FATOR DE RISCO NA
POTENCIALIZAÇÃO DOS EFEITOS DO IMOBILISMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de Concentração: Processo saúde-doença

ORIENTADORA: Profa. Dra. Patrícia
Oehlmeyer Nassar

CASCADEL – PR

Janeiro/2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARCELA APARECIDA LEITE

**PERIODONTITE EXPERIMENTAL NA POTENCIALIZAÇÃO DOS EFEITOS DO
IMOBILISMO NO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientadora Profa. Dra. Patricia Oehlmeyer Nassar – UNIOESTE

Prof. Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini – UNIOESTE

Prof. Dr. Fábio André dos Santos – UEPG

CASCADEL
(Janeiro/2017)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus**, por permitir que eu tenha saúde e discernimento para seguir nessa caminhada e por me ajudar e conduzir meu caminho nas escolhas que faço.

Agradeço à minha **família**, aos meus pais **Jaso** e **Suely**, por me educarem, me permitirem estudar tranquilamente, tanto na graduação quanto na pós-graduação, compreenderem as minhas escolhas, serem pacientes e me apoiarem em todas as decisões. Agradeço também à minha irmã **Luciane**, que, por ser mais velha, foi minha primeira porta para o mundo e inspiração. Obrigada por contribuírem para eu me tornar quem sou hoje, pessoal e profissionalmente.

Agradeço à **Erica**, também professora, hoje colega de trabalho, amiga e, acima de tudo, mentora, que me incentiva a tomar decisões, a “ir pro mundo” e enxergar novos horizontes. Quando estou prestes a estacionar, ela me empurra para algo novo e me faz ver que o mundo é algo muito maior. Se não fosse ela, eu não teria tomado a decisão de tentar o Mestrado. Obrigada!

Agradeço à minha Orientadora **Patricia**, primeiramente por me aceitar como sua orientanda, respeitar e aceitar a minha proposta de pesquisa e também por ser uma pessoa que me deixou mais calma e me permitiu seguir mais tranquila nessa caminhada.

Agradeço ao professor **Carlos**, por colaborar com o meu projeto, pelos ensinamentos e dicas relacionadas à minha pesquisa.

Agradeço à **Claudia** e à **Mariko**, que foram minhas professoras e hoje são minhas colegas de trabalho e amigas, agradeço imensamente por me ajudarem e me apoiarem há tantos anos e também nos estágios da graduação com os alunos, o que foi muito importante para mim e me ajudou nesses dois anos de Mestrado.

Agradeço às minhas amigas **Bruna**, **Daiane** e **Anáíma**, por existirem e serem minhas amigas, me apoiarem direta ou indiretamente. Principalmente, à **Bruna**, por me aguentar estressada no pilates e compreender minha ausência!

Agradeço à **Tatiane**, minha colega de mestrado e de laboratório, que juntas descobrimos como é esse mundo fascinante de pesquisa com animais e fomos crescendo e desenvolvendo nosso projeto, agradeço o apoio e a ajuda.

Fico feliz e agradeço à **Tatiane**, mais uma vez, à **Alessandra** e à **Bruna**, por serem as “amigas que o mestrado trouxe” e tornar os dias de aula mais agradáveis.

Agradeço ao **Pedro** e à **Bruna**, por colaborarem no meu projeto. Agradeço também à **Camila**, que foi minha aluna, e hoje também faz mestrado. Sempre disposta a me ajudar, colaborou com meu projeto, me ensinou muita coisa relacionada à pesquisa com animais, ao laboratório, dias cheios de trabalho, mas com muitas risadas.

Agradeço à **Regina** e à **Vanessa**, que também me ajudaram muito no laboratório, quando eu não sabia muita coisa me ensinaram e sanaram muitas dúvidas.

Agradeço também à **Ana**, por nos ajudar no laboratório e pelas conversas e muitas risadas.

Agradeço a **todos os professores** do Programa de Mestrado em Biociências e Saúde, pelos ensinamentos e dicas no decorrer do curso, em especial:

À professora **Lucinéia**, por me acolher, me dar dicas, ler meu trabalho, ter participado da minha banca de qualificação, por todas as correções e também pelos ensinamentos, além do apoio, por me acolher no grupo de pesquisa e me incentivar a crescer.

À professora **Rose**, pelos ensinamentos, por estar sempre disposta a me ajudar no laboratório quando precisei e também pelo apoio e acolhida no grupo de pesquisa.

Ao professor **Gladson**, por colaborar com meu projeto, participar da minha banca de qualificação e defesa e também por orientar sobre como poderia dar certo o projeto de pesquisa, sou muito grata.

Às professoras **Maria Lúcia Bounfleur**, **Sandra** e **Sabrina**, por estarem ajudando no início dessa caminhada, com as disciplinas e dicas relacionadas ao projeto que foram essenciais para iniciar a pesquisa.

Agradeço também à **banca examinadora**, por dispor de tempo para ler minha dissertação e estar presente para minha defesa.

Por fim, agradeço a **todos que, em algum momento, colaboraram** para o desenvolvimento do projeto e da pesquisa, seja no biotério, seja nos laboratórios, no desenvolvimento da dissertação, sou imensamente grata a todos!

“Muitos têm pernas, mas não sabem caminhar, têm liberdade para correr riscos, mas vivem no cárcere do medo. Não lhes falta musculatura, mas têm déficit de ousadia. E ousadia não é falta de medo, mas a capacidade para dominá-lo.”

(O Colecionador de Lágrimas – Augusto Cury)

RESUMO GERAL

Objetivo: Avaliar se a doença periodontal, por meio da inflamação sistêmica, potencializa os efeitos deletérios da imobilização do músculo estriado esquelético, colaborando para o desenvolvimento da atrofia muscular por desuso.

Metodologia: Foram utilizados 40 ratos Wistar, divididos em quatro grupos: 1) Grupo Controle (GC); 2) Doença Periodontal (GDP); 3) Imobilizado (GI); 4) Doença Periodontal Imobilizado (GDPI). A doença periodontal foi induzida pelo método de ligadura, durante 30 dias e a imobilização do membro pélvico direito foi realizada com atadura gessada, por 15 dias. Antes da eutanásia, foram avaliados o limiar nociceptivo e força muscular de preensão. Após, o músculo sóleo foi dissecado e processado para contagem de sarcômeros e análise morfológica e morfométrica. Para análise dos dados, foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguida do post test Tukey, com $p < 0,05$.

Resultados: Os grupos GI e GDPI apresentaram menor peso muscular, força muscular de preensão e número de sarcômeros comparados ao GC. O GDP apresentou redução da força muscular e do limiar nociceptivo após 15 dias de doença periodontal e aumento de tecido conjuntivo comparado ao GC. O GDPI apresentou menor comprimento muscular e limiar nociceptivo comparados aos demais grupos. O GI apresentou redução da área de secção transversa e menor diâmetro, aumento no número de núcleos e razão núcleo/fibra, diminuição no número de capilares e razão capilar/fibra, com aumento de tecido conjuntivo. No grupo GDPI, houve resultados significativos para aumento da razão núcleo/fibra, diminuição de capilares e aumento de tecido conjuntivo quando comparado ao grupo GI. O grupo GDPI apresentou maior degeneração do tecido muscular e aumento de células inflamatórias quando comparado aos outros grupos.

Conclusão: A doença periodontal potencializou os efeitos deletérios da imobilização do músculo estriado esquelético, por meio da intensa destruição do tecido muscular, com significativo aumento do tecido conjuntivo, da razão núcleo/fibra e infiltrado inflamatório, significativa diminuição da vascularização e redução do comprimento muscular, com consequente redução da força muscular e limiar nociceptivo.

Palavras-chave: Periodontite. Inflamação. Imobilização. Atrofia muscular.

GENERAL ABSTRACT

Objective: To evaluate whether periodontal disease, through systemic inflammation, can potentiate the deleterious effects of immobilization of the skeletal striated muscle, contributing to the development of muscle atrophy due to disuse. **Methods:** Forty *Wistar* rats were divided into four groups: 1) Control Group (CG), 2) Periodontal Disease (GPD) 3) Immobilized (IG) and 4) Immobilized with Periodontal Disease (IPDG). Periodontal disease was induced for 30 days, with ligature method, and the immobilization of the right pelvic limb was performed with cast bandage for 15 days. Prior to euthanasia, the nociceptive threshold and muscular grasping force were evaluated. Afterwards, the soleus muscle was dissected and processed for sarcomere counting and morphological and morphometric analysis. For analysis of the data, the one-way ANOVA followed by the Tukey post test, with $p < 0.05$. **Results:** The IG and IPDG groups presented lower muscle weight, lower muscular grip strength and less number of sarcomeres compared to CG. The PDG showed reduction of muscle strength and nociceptive threshold after 15 days of periodontal disease and increase of connective tissue compared to CG. The IPDG presented lower muscle length and nociceptive threshold compared to the other groups. The IG presented a reduction in the cross-sectional area and a smaller diameter, an increase in the number of nuclei and a nucleus/fiber ratio, a decrease in the number of capillaries and a capillary/fiber ratio, with an increase in connective tissue. In the IPDG group, there were significant results for increased nucleus/fiber ratio, decreased capillaries and increased connective tissue when compared to the IG group. The IPDG group presented greater muscle tissue degeneration and increased inflammatory cells when compared to the other groups. **Conclusion:** Periodontal disease potentiated the deleterious effects of immobilization of the skeletal striated muscle, through intense destruction of muscle tissue, with significant increase of connective tissue, nucleus/fiber ratio and inflammatory infiltrate, significant reduction of vascularization and reduction of muscle length, with consequent reduction of muscle strength and nociceptive threshold.

Keywords: Periodontitis. Inflammation. Immobilization. Muscle atrophy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema do dente e as estruturas de proteção e suporte, periodonto..	17
Figura 2	Regulação da remodelação óssea no osso alveolar	18
Figura 3	Esquema demonstrando a distribuição do tecido conjuntivo frouxo no músculo estriado esquelético	22
Figura 4	Corte transversal do músculo estriado esquelético	22
Figura 5	Esquema da estrutura do músculo estriado esquelético, representando a unidade contrátil, o sarcômero	23
Figura 6	Randomização dos grupos experimentais	31
Figura 7	Procedimentos para coleta de dados, representação da linha de tempo compreendendo os 37 dias de experimento	31
Figura 8	Indução da Doença Periodontal	32
Figura 9	Aparato de imobilização	33
Figura 10	Avaliação da Nocicepção	34
Figura 11	Avaliação da Força de Preensão	35
Figura 12	Fotomicrografia de uma fibra muscular em corte longitudinal	38
Figura 13	Evolução do peso corporal dos animais no decorrer dos 30 dias de experimento	42
Figura 14	Estimativa do número de sarcômeros	43
Figura 15	Fotomicrografias do músculo sóleo de ratos Wistar em secção transversal, coloração HE	46
Figura 16	Fotomicrografias do músculo sóleo de ratos Wistar, em secção transversal, coloração Tricrômico de Masson	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de Força Muscular de Preensão (gf) de todos os grupos estabelecidos	41
Tabela 2	Valores das avaliações da Nocicepção (gf) do músculo de todos os grupos estabelecidos	41
Tabela 3	Valores do peso e comprimento muscular de todos os grupos	42
Tabela 4	Área de secção transversa, menor diâmetro e tecido conjuntivo	44
Tabela 5	Total de núcleos e razão núcleo por fibra	44
Tabela 6	Número de capilares e razão capilar por fibra.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AV1	Avaliação 1
AV2	Avaliação 2
AV3	Avaliação 3
ATP	Adenosina trifosfato
CaSO ₄	Sulfato de cálcio
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DP	Doença periodontal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GC	Grupo controle
GDP	Grupo doença periodontal
GDPI	Grupo doença periodontal imobilizado
GI	Grupo imobilizado
HE	Hematoxilina e eosina
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IFN- γ	Interferon gama
LABEF	Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional
LAFEM	Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo
LELRF	Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MMP-1	Metaloproteinase de matriz 1
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2

MMP-3	Metaloproteinase de matriz 3
MMP-8	Metaloproteinase de matriz 8
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
OPG	Osteoprotegerina
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
Th-1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th-2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
OBJETIVOS	16
Objetivo geral	16
Objetivos específicos	16
REVISÃO GERAL DE LITERATURA	17
DOENÇA PERIODONTAL	17
MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO	21
IMOBILIZAÇÃO E ATROFIA MUSCULAR.....	24
DOENÇA PERIODONTAL, INFLAMAÇÃO E ATROFIA MUSCULAR POR DESUSO	27
MATERIAL E MÉTODOS	30
POPULAÇÃO DO ESTUDO E AMOSTRA	30
PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS.....	30
INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL.....	31
PROTOCOLO DE IMOBILIZAÇÃO.....	32
AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO.....	33
AVALIAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR DE PREENSÃO	35
EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	36
ANÁLISE DO MÚSCULO SÓLEO	36
Comprimento e peso muscular	36
Análise morfológica e morfométrica	36
ASPECTOS ÉTICOS	38
ANÁLISE DOS DADOS	38
RESULTADOS	40
FORÇA MUSCULAR DE PREENSÃO E NOCICEPÇÃO	40
PESO CORPORAL, PESO MUSCULAR E COMPRIMENTO MUSCULAR.....	41
ESTIMATIVA DO NÚMERO DE SARCÔMEROS E MEDIDAS MORFOMÉTRICAS	43
ANÁLISE MORFOLÓGICA DO MÚSCULO SÓLEO.....	45

DISCUSSÃO	48
CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	55
ARTIGO CIENTÍFICO	64
ANEXOS	87

INTRODUÇÃO GERAL

A doença periodontal (DP) está intimamente relacionada com a higiene bucal. Desse modo, o acúmulo excessivo de bactérias na superfície dentária favorece o desenvolvimento do biofilme dental e uma reação inflamatória associada a fatores de riscos, como obesidade, tabagismo, diabetes e estresse mental (GARLET et al., 2012). A prevalência da DP moderada a grave em adultos no Brasil é de 15,3% e ela está intimamente relacionada com o bem-estar e qualidade de vida (VETTORE; MARQUES; PERES, 2013).

A DP é caracterizada por uma inflamação que afeta os tecidos que circundam e suportam os dentes, o periodonto. As duas formas comuns de DP são a gengivite e a periodontite. A gravidade dessa doença depende da interação de espécies bacterianas específicas com a resposta imune do hospedeiro e fatores de risco pré-existentes, provocando uma resposta que pode ser exacerbada ou ineficiente (GARLET et al., 2012).

A resposta inicial do hospedeiro compreende um reconhecimento inato dos componentes microbianos por células hospedeiras da gengiva, recrutando outras células para o local da inflamação (CRAIG et al., 2013). Em decorrência disso ocorre a produção de mediadores inflamatórios, tais como espécies reativas de oxigênio (EROs), quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias que ajudam a definir a progressão da doença (GARLET et al., 2012; KHALAF; LÖNN; BENGTSSON, 2014; LEISHMAN; SEYMOUR; FORD, 2013; RAMSEIER et al., 2009). A ativação desses mediadores inflamatórios permite que a DP tenha potencial para contribuir significativamente com a resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro (LEISHMAN; SEYMOUR; FORD, 2013). Um dos efeitos da

inflamação sistêmica é a ação das citocinas inflamatórias sobre a perda de massa muscular (WINKELMAN, 2004).

A homeostase do músculo esquelético é caracterizada pelo equilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas e os mediadores pró-inflamatórios parecem ter um papel importante na atrofia muscular (HADDAD et al., 2005; LANG; FROST; VARY, 2007; POULSEN, 2012; TSUJINAKA et al., 1996; ZAMIR et al., 1992). As citocinas e radicais livres associados à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) afetam a microcirculação, causando hipóxia neuronal, degeneração axonal e dano muscular (DE LETTER et al., 2001).

Condições humanas que levam a um repouso prolongado no leito e imobilização causam perda de carga mecânica na musculatura esquelética, diminuição da atividade neuromuscular e redução na produção de energia, levando à atrofia muscular por desuso e consequente fraqueza muscular generalizada (LANGHANS et al., 2014; OCHALA et al., 2011; POULSEN, 2012). Esse fator associado à presença de mediadores inflamatórios caracteriza uma perda potencial de massa muscular, uma vez que a inflamação sistêmica por si só reduz a capacidade de geração de força muscular (FINK et al., 2008; POULSEN, 2011).

Uma vez que a DP é uma doença inflamatória com efeitos sistêmicos e subdiagnosticada em muitos pacientes e sabendo-se que a inflamação sistêmica promove perda de massa muscular, faz-se necessário investigar o efeito dessa doença no músculo estriado esquelético em condições de repouso prolongado. Dessa forma, a periodontite experimental, por meio dos efeitos inflamatórios sistêmicos, pode potencializar os efeitos deletérios da imobilização da musculatura esquelética periférica, fornecendo evidências científicas para identificar a doença periodontal como um fator de risco e aprimorar o conhecimento relacionado à fisiopatologia da atrofia muscular decorrente de repouso durante o processo saúde-doença.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar se a doença periodontal, por meio da inflamação sistêmica, potencializa os efeitos deletérios da imobilização do músculo estriado esquelético, colaborando para o desenvolvimento da atrofia muscular por desuso.

Objetivos específicos

- a) Analisar a morfologia e a morfometria do músculo sóleo;
- b) avaliar a nocicepção e a força muscular de preensão dos animais;
- c) realizar a contagem dos sarcômeros do músculo sóleo dos animais.

REVISÃO GERAL DE LITERATURA

DOENÇA PERIODONTAL

O periodonto é uma estrutura complexa e dinâmica composta por tecidos moles e duros, abrangendo a mucosa gengival (epitélio e conjuntivo), cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar que, juntos, oferecem proteção e suporte para ligação dos dentes na mandíbula e maxila (Figura 1) (GARLET et al., 2012; LINDHE; KARRING; LANG, 2005).

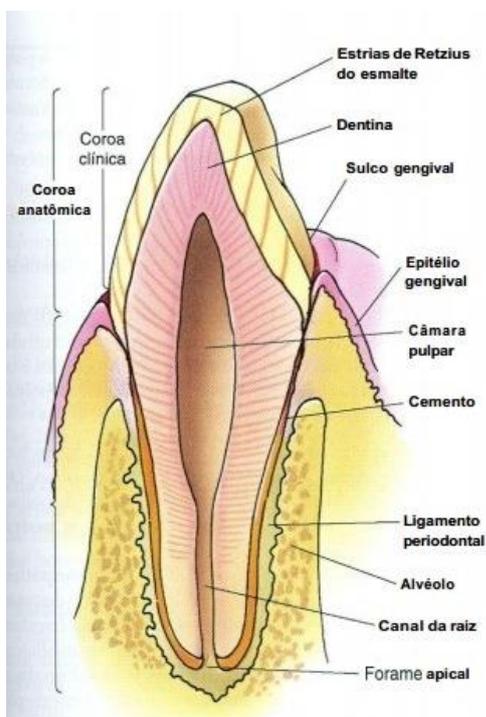


Figura 1 – Esquema do dente e as estruturas de proteção e suporte, periodonto.
Fonte: Gartner e Hiatt (1999).

No osso alveolar, o principal mecanismo que regula a remodelação óssea é conduzido pelo receptor RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa B), presente na superfície dos pré-osteoclastos, e o seu ligante RANKL, que é uma proteína ligada à membrana, responsável pela diferenciação dos pré-osteoclastos em osteoclastos maduros, permitindo a reabsorção óssea. A osteoprotegerina (OPG) é uma molécula que bloqueia a ligação do RANK ao RANKL e, assim, evita osteoclastogênese. A produção de RANKL e OPG é controlada por estímulos sistêmicos e locais, incluindo hormônios, mediadores inflamatórios e produtos bacterianos. O equilíbrio entre os níveis de RANKL e OPG promove a homeostase entre a reabsorção óssea pelos osteoclastos e a formação do osso pelos osteoblastos em condições fisiológicas normais (Figura 2) (BELIBASAKIS; BOSTANCI, 2012; GARLET et al., 2012).

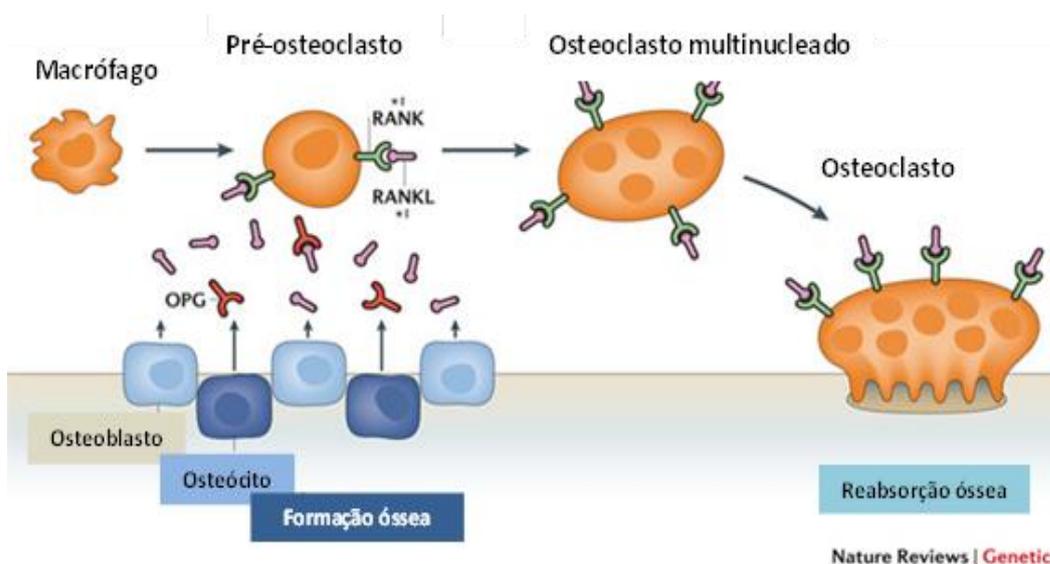


Figura 2 – Regulação da remodelação óssea no osso alveolar. O receptor RANK do pré-osteoclasto se liga à OPG e ativa os osteoblastos, que promovem a formação óssea. Na diminuição de OPG, o receptor RANK se liga ao RANKL, promovendo a reabsorção óssea.

Fonte: adaptado de Nature (2016).

No periodonto clinicamente saudável, o equilíbrio entre bactérias e a resposta do hospedeiro resulta em resistência à colonização. Os dentes apresentam superfície dura e não descamativa. Dessa maneira, o acúmulo excessivo de bactérias na sua superfície favorece o desenvolvimento do biofilme dental e uma reação inflamatória pode ser iniciada com o objetivo de erradicar

esses invasores (GARLET et al., 2012). Portanto, as doenças periodontais são infecções causadas predominantemente por microrganismos Gram-negativos que colonizam a superfície dentária levando ao acúmulo de biofilme ao longo da margem gengival, que resulta em uma reação inflamatória dos tecidos moles. As formas mais comuns de doença periodontal são a gengivite e a periodontite (HASTURK; KANTARCI; VAN DYKE, 2012; LINDHE; KARRING; LANG, 2005).

O biofilme dental pode se acumular supra-gengivalmente, ou seja, na coroa clínica dos dentes, mas também abaixo da margem gengival, isto é, na área subgengival do sulco ou da bolsa periodontal. Com isso, dependendo da região e profundidade da bolsa em que ocorre o biofilme, haverá diferenças na microbiota. Com o acúmulo de bactérias na superfície sólida, ocorre a formação de um biofilme, que fornece nutrientes às bactérias e as protege de agentes antimicrobianos (DARVEAU; TANNER; PAGE, 1997; LINDHE; KARRING; LANG, 2005).

Após 10 a 15 dias de acúmulo de placa, sinais clínicos da gengivite se estabelecem na maioria das pessoas, atingem tecidos moles, epitélio e tecido conjuntivo. A gengivite pode ser reversível com a remoção dessa placa, ocorrendo o desaparecimento dos sinais clínicos da inflamação. Desse modo, a remoção diária do biofilme dental é capaz de prevenir a DP (LINDHE; KARRING; LANG, 2005; LÖE, 2000). A progressão da gengivite para periodontite depende da ocorrência simultânea de vários fatores, como a manutenção do biofilme (por baixa resistência aos depósitos bacterianos ou por executar de forma inadequada a higiene bucal) e se o hospedeiro for suscetível tanto sistêmica quanto localmente (LINDHE; KARRING; LANG, 2005).

Os processos inflamatórios e imunológicos agem nos tecidos gengivais para proteger contra o ataque microbiano e impedir que os microrganismos se disseminem ou invadam os tecidos. A resposta inicial do hospedeiro compreende um reconhecimento inato dos componentes microbianos por células hospedeiras da gengiva, recrutando outras células para o local da inflamação que consiste basicamente em neutrófilos, monócitos e macrófagos (CRAIG et al., 2013). Decorrente da inflamação ocorre a produção de mediadores inflamatórios, tais como EROs, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, que funcionam como biomarcadores e ajudam a definir a progressão da doença

periodontal (GARLET et al., 2012; KHALAF; LÖNN; BENGTSSON, 2014; LEISHMAN; SEYMOUR; FORD, 2013; RAMSEIER et al., 2009).

As citocinas são proteínas solúveis, secretadas por células, que agem como mensageiras transmitindo sinais para outras células. Elas realizam inúmeras ações, incluindo a iniciação e a manutenção das respostas imune e inflamatória, são numerosas e muitas realizam funções que se sobrepõem e são interligadas, formando uma rede ativa que controla a resposta do hospedeiro (LINDHE; KARRING; LANG, 2005). A principal citocina produzida no curso da DP é o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) que regula positivamente a produção de outras citocinas, tais como as interleucinas (IL) IL-6 e IL-1 β (GARLET et al., 2006; GARLET et al., 2012; LEISHMAN; SEYMOUR; FORD, 2013; RAMSEIER et al., 2009). Além disso, também ocorre a ativação de linfócitos T e a migração de outras células inflamatórias para o tecido periodontal (CUTLER; JOTWANI, 2004). A resposta imune humoral é promovida pela célula T-auxiliar tipo 2 (Th-2) que produz IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-6. Já os linfócitos T-auxiliar tipo 1 (Th-1) atuam na resposta mediada por células e liberam TNF- α , IL-2 e Interferon- γ (IFN- γ) (LINDHE; KARRING; LANG, 2005).

Os fibroblastos gengivais, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares são importantes fontes de mediadores inflamatórios, incluindo as citocinas, que expressam as MMPs, como as colagenases MMP-1, MMP-3, MMP-8 e as gelatinases MMP-2 e MMP-9, que causam a destruição tecidual por meio da degradação dos colágenos do tipo I, II e III (SEABRA, 2006). Além disso, as citocinas regulam a ação das MMPs relacionada à ativação das vias de reabsorção óssea RANK, RANKL e OPG. Dessa forma, a destruição do colágeno associada à reabsorção óssea promove destruição dos tecidos de suporte, como ligamentos e osso alveolar, caracterizando a forma mais grave da DP, a periodontite (GARLET et al., 2012; LORENCINI et al., 2009; LINDHE; KARRING; LANG, 2005; SAĞLAM et al., 2015).

A gravidade da DP, portanto, está associada à interação de espécies bacterianas específicas com a resposta imune do hospedeiro, que desempenha um papel importante na destruição do tecido periodontal. Uma vez que essa resposta pode ser exacerbada ou ineficiente, ocorre o desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, que irá determinar a intensidade da ativação

das MMPs e reabsorção óssea (GARLET et al., 2012; NASSAR et al., 2014). Além disso, a DP está associada a alguns fatores de risco sistêmicos. Estudos em animais foram realizados para mostrar a associação da doença com fatores sistêmicos incluindo diabetes (UM et al., 2010; NASSAR et al., 2014), obesidade (BRANDALERO et al., 2012; DO NASCIMENTO et al., 2013), doença cardiovascular (BRITO et al., 2013; TOREGANI et al., 2016) e também o estresse mental (ZHAO et al., 2012), fatores esses que permitem ao hospedeiro ficar mais suscetível para ocorrência da DP.

Diante do exposto, a DP tem potencial para desencadear significativamente uma resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro, seja por meio da disseminação sistêmica de produtos bacterianos, devido à proximidade do biofilme bacteriano com o sistema vascular periodontal (DARVEAU; TANNER; PAGE, 1997), seja pela difusão de citocinas e de complexos imunes, com possibilidade de desencadear efeitos adversos em demais sistemas do organismo.

MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO

O músculo estriado esquelético é formado por fibras que estão organizadas em grupos de feixes envolvidos por tecido conjuntivo que as mantém unidas e recobre o músculo todo, o epimísio. Esses feixes de fibras são separados e envolvidos por septos que partem do epimísio, o perimísio. Cada fibra muscular é envolvida por outra camada de tecido conjuntivo, formado pela lâmina basal, o endomísio (Figura 3). No músculo, o tecido conjuntivo é frouxo e contém fibroblastos, macrófagos, colágeno, elastina e ainda os vasos sanguíneos que penetram o músculo através dos septos e formam extensa rede de capilares entre as fibras musculares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As fibras musculares são células longas, cilíndricas, que medem cerca de 10-100 μm de diâmetro e até 10 cm de comprimento (LOWE; ANDERSON, 2014; SILVA; CARVALHO, 2007). São células que contêm muitos filamentos, as miofibrilas, são multinucleadas e os núcleos estão localizados na

periferia, nas proximidades do sarcolema que é a membrana celular (Figura 4). O citosol da célula muscular é denominado sarcoplasma e o retículo endoplasmático liso de retículo sarcoplasmático (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

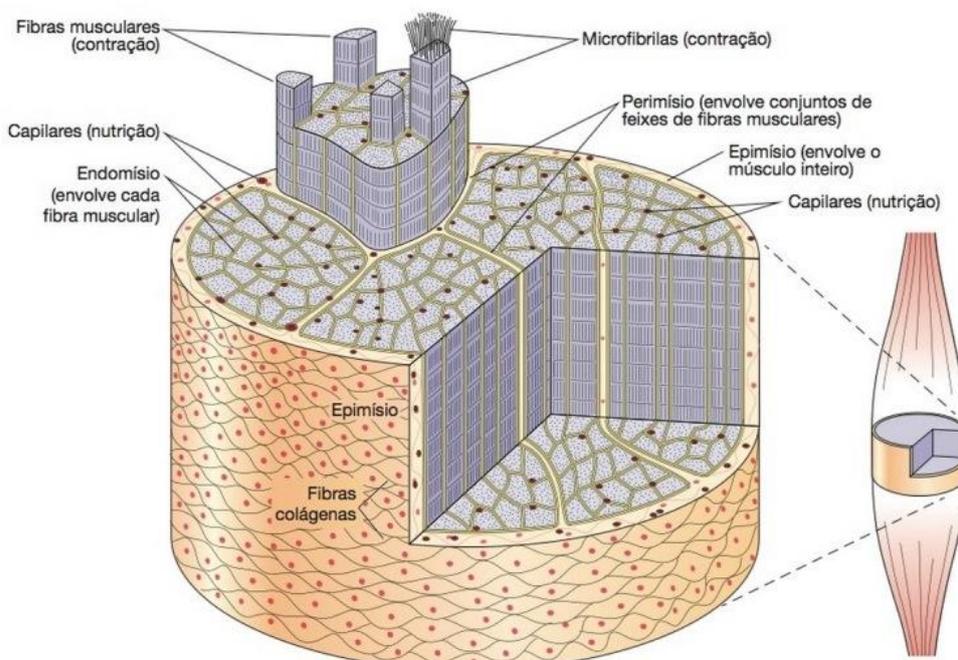


Figura 3 – Esquema demonstrando a distribuição do tecido conjuntivo frouxo no músculo estriado esquelético.

Fonte: Junqueira e Carneiro (2013).

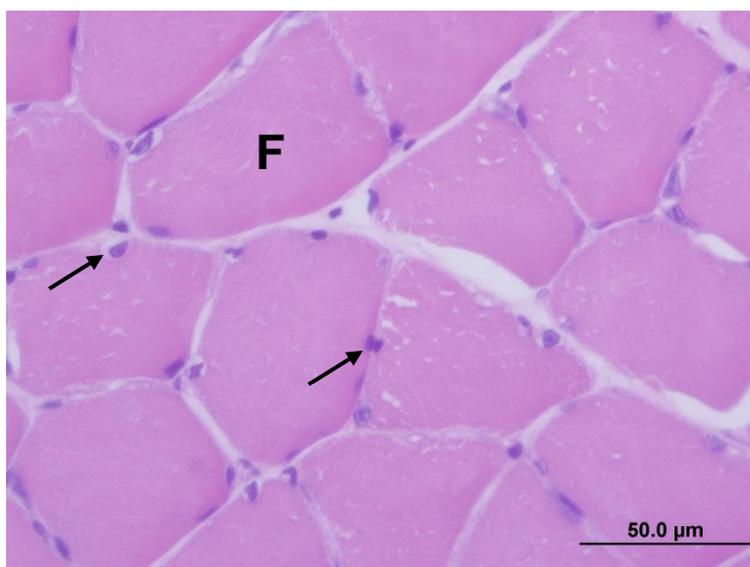


Figura 4 – Corte transversal do músculo estriado esquelético. Fibra muscular (F), núcleo ocupando posição periférica (setas). Cada célula possui centenas de miofibrilas.

Fonte: O autor.

Quando observadas ao microscópio de luz, as fibras musculares esqueléticas mostram estriações transversais, que se devem à repetição de unidades iguais, chamadas de sarcômeros, compostos por faixas escuras e claras. A faixa escura recebe o nome de banda A, a faixa clara é a banda I e, no centro de cada banda I, há uma linha transversal escura, a linha Z. A banda A apresenta zona mais clara no centro denominada banda H. Cada sarcômero mede aproximadamente $2,5\mu\text{m}$ e é formado pela parte da miofibrila que fica entre duas linhas Z sucessivas (Figura 5) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). As miofibrilas medem de 1 a $2\mu\text{m}$ e são compostas por filamentos finos de actina e grossos de miosina, dispostos longitudinalmente e organizados em uma distribuição simétrica e paralela. Os filamentos de actina partem da linha Z e vão até a borda externa da banda H, já os filamentos de miosina ocupam o centro dos sarcômeros (LOWE; ANDERSON, 2014).

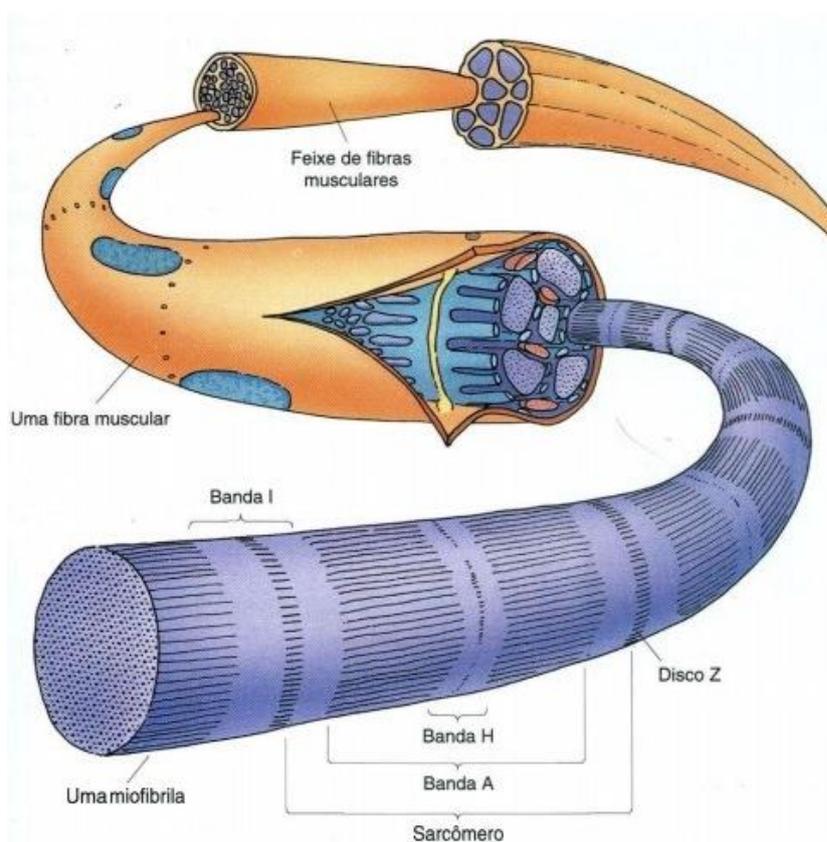


Figura 5 – Esquema da estrutura do músculo estriado esquelético, representando a unidade contrátil, o sarcômero.

Fonte: Gartner e Hiatt (1999).

De acordo com a estrutura e composição molecular, as fibras musculares estriadas esqueléticas podem ser identificadas como tipo I (contração lenta) ou tipo II (contração rápida). As fibras do tipo I são menores, de coloração vermelha escura, ricas em mioglobina, com sistema vascular abundante, maior número de mitocôndrias e são adaptadas para contrações continuadas, utilizando metabolismo oxidativo. Em contrapartida, as fibras do tipo II são maiores, vermelhas mais claras, contém pouca mioglobina, sistema vascular menos extenso, menor número de mitocôndrias e são adaptadas para contrações rápidas e descontínuas, dependem principalmente da glicólise como fonte de energia (GUYTON; HALL, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Todos os músculos possuem porcentagens variadas de fibras do tipo I e II. Assim, o que determina o fenótipo muscular é a demanda funcional à qual o músculo é submetido, caracterizando um músculo como de contração lenta ou rápida (MINAMOTO, 2005). O sóleo é um músculo extensor, antigravitacional (FERREIRA et al., 2004) e tem predominância de fibras de contração lenta (Tipo I); desse modo, está envolvido em atividades mais prolongadas dos membros inferiores, em que as fibras estão ativadas durante 90% do tempo (GUYTON; HALL, 2006; MINAMOTO, 2005).

Quando há alterações nos estímulos recebidos pelo músculo, pode ocorrer mudança no tipo de fibra muscular. Em condições de atrofia muscular, por exemplo, o músculo sóleo passa de contração lenta, com fibras predominantes do tipo I, para um fenótipo de contração rápida, com predominância de fibras do tipo II (MINAMOTO, 2005). Portanto, os músculos apresentam características inatas de plasticidade e adaptabilidade; eles podem mudar seu tamanho para se adaptar a estímulos fisiológicos externos e internos (CHO; KIM; SONG, 2016).

IMOBILIZAÇÃO E ATROFIA MUSCULAR

A atrofia é definida como diminuição no tamanho de um tecido ou órgão, devido ao encolhimento celular. Trata-se de um processo ativo controlado por vias de sinalização específicas e programas de transcrição. A diminuição do

tamanho da célula é causada pela perda de organelas, citoplasma e proteínas (BONALDO; SANDRI, 2013). A atrofia muscular ocorre quando a degradação da proteína excede a sua síntese, conduzindo a uma redução da área da secção transversa de miofibrilas, diminuição de proteínas contráteis, perda de mionúcleos devido à apoptose mionuclear, tendo como consequência a diminuição da força muscular (POWERS; KAVAZI; MCCLUNG, 2007; FANZANI et al., 2012).

Os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da atrofia muscular por desuso ainda não são completamente compreendidos. A regulação da atividade das proteinases intracelulares pode desempenhar um papel importante na alteração do fenótipo do músculo esquelético. Quatro sistemas proteolíticos estão envolvidos na degradação das proteínas musculares: autofagia, o sistema ubiquitina-proteassoma, o sistema de calpaína e o sistema de caspase. Todos os quatro sistemas proteolíticos estão ativos durante a atrofia muscular em seres humanos e animais (BERTHON et al., 2007; POWERS; KAVAZI; MCCLUNG, 2007).

A principal via envolvida no mecanismo de atrofia muscular é o sistema ubiquitina-proteossoma ATP-dependente, que degrada proteínas de vida curta e promove a remoção de proteínas do sarcômero mediante mudanças na atividade muscular. A autofagia regula os níveis de proteínas e organelas de vida longa atuando na rotatividade dos componentes celulares. Quando estimulada excessivamente, é prejudicial e pode conduzir à morte celular independentemente de caspase (BROOKS; MYBURGH, 2014; BONALDO; SANDRI, 2013; FANZANI et al., 2012). Por fim, as calpaínas e a caspase-3 são proteases-chave que iniciam a proteólise muscular por degradação dos sarcômeros em série e morte celular (PIERRE et al., 2016).

Com a alteração da relação síntese/degradação durante a atrofia muscular, as proteínas da matriz extracelular (MEC) podem desempenhar um papel fundamental na regulação da integridade das miofibrilas. As MMP-2 e MMP-9 exercem um amplo espectro de ação para um número de diferentes proteínas da MEC, incluindo o colágeno, e estão difundidas no corpo humano, incluindo os músculos esqueléticos. Essas MMPs, em uma situação de estresse como a atrofia muscular por desuso, promovem a degradação de Colágeno do tipo I e IV (GIANNELLI et al., 2005).

O músculo estriado esquelético tem a capacidade de alterar o seu fenótipo dependendo de estímulos e da carga mecânica colocada sobre ele. Desse modo, sua atrofia pode ocorrer devido às doenças como câncer, sepse, diabetes, insuficiência renal, doença pulmonar obstrutiva crônica, ou na ausência de carga mecânica durante longos períodos de inatividade, como repouso no leito, imobilização dos membros, voo espacial ou relaxamento do diafragma durante a ventilação mecânica (BROOKS; MYBURGH, 2014; POWERS; KAVAZI; MCCLUNG, 2007). Estudos em modelos animais de indução de atrofia muscular por desuso mostram que a inatividade muscular é um fator dominante que provoca atrofia. Coutinho et al. (2004) imobilizaram o membro posterior esquerdo de ratos por três semanas e observaram atrofia das fibras musculares, com perda da massa muscular, diminuição do número de sarcômeros e redução da área de secção transversa das fibras. Paixão (2011) encontrou resultados semelhantes quando imobilizou o membro pélvico de ratos, incluindo músculo sóleo e gastrocnêmio, por 15, 30 e 45 dias, observando que houve uma progressão na perda de massa muscular e diminuição da área da secção transversa das fibras em ambos os músculos estudados, evidentes aos 15 dias de imobilização e mais pronunciados aos 45 dias.

No estudo de Zhao et al. (2010), a inatividade muscular foi induzida mantendo o membro pélvico de ratos em suspensão durante 14 dias. Foram observadas alterações estruturais nas mitocôndrias das células musculares e alterações de fibra muscular com desorganização dos sarcômeros e desalinhamento da banda Z. Cornachione et al. (2014) imobilizaram o tornozelo de ratos por 10 dias e observaram alterações estruturais na célula muscular incluindo variações no tamanho da fibra, centralização nuclear, rarefação do citoplasma e diminuição das fibras do tipo I com aumento das fibras do tipo II no músculo sóleo. Desse modo, a perda completa de estímulos mecânicos do músculo esquelético é um fator dominante que provoca atrofia, com perda de força específica nos músculos, resultando em uma severa e específica condição de fraqueza muscular (BROOKS; MYBURGH, 2014).

A inatividade devido ao repouso no leito ocorre por necessidade em muitas doenças. Assim, a imobilização pode ocorrer como resultado de várias lesões, que na maior parte não é do músculo esquelético. Logo, a influência que a

imobilização tem sobre o músculo esquelético é considerada um efeito secundário (BROOKS; MYBURGH, 2014).

Em casos de doenças que apresentam inflamação sistêmica, a ação de citocinas pró-inflamatórias contribui para a disfunção muscular por meio de estimulação direta da perda de proteína nas células musculares, ativação de uma cascata de eventos que promovem a lesão oxidativa e resistência à insulina (REID; LI, 2001). A homeostase do músculo esquelético é caracterizada pelo equilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas. Citocinas como IL-6 e TNF- α parecem ter um papel importante na atrofia muscular, aumentando a degradação de proteínas pelo aumento da expressão de enzimas que controlam o sistema ubiquitina-proteossoma, com consequente alteração desse equilíbrio, induzindo a perda de massa muscular (HADDAD et al., 2005; LANG; FROST; VARY, 2007; POULSEN, 2012; TSUJINAKA et al., 1996; ZAMIR et al., 1992). Além disso, a liberação dessas citocinas, durante o processo inflamatório, ativa as MMPs que são enzimas que atuam degradando o colágeno contribuindo para a atrofia muscular (SCHOSER; BLOTTNER; STUERENBURG, 2002; CARMELI; HAIMOVITCH; NEMCOVSKY, 2006; ALFAKRY et al., 2016).

Citocinas e radicais livres estão associados à Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica e afetam a microcirculação e músculos, causando hipóxia neuronal, degeneração axonal e dano muscular (DE LETTER et al., 2001). Diante do exposto, a inatividade por imobilização prolongada e a inflamação sistêmica podem contribuir para a atrofia muscular, afetando diretamente as fibras musculares e o tecido conjuntivo do músculo estriado esquelético.

DOENÇA PERIODONTAL, INFLAMAÇÃO E ATROFIA MUSCULAR POR DESUSO

Na doença periodontal, ocorre produção de mediadores inflamatórios, que funcionam como biomarcadores e ajudam a definir a progressão da doença periodontal (GARLET et al., 2012; KHALAF; LÖNN; BENGTSSON, 2014; LEISHMAN; SEYMOUR; FORD, 2013; RAMSEIER et al.,

2009). Com o início da doença periodontal moderada à severa, os níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 e IL-6, ficam elevados e induzem resposta inflamatória de fase aguda (CRAIG et al., 2013; LEISHMAN; SEYMOUR; FORD, 2013; OFFENBACHER; BARROS; BECK, 2008).

No estudo de Ionel et al. (2016), foram coletadas amostras de sangue antes e depois de sete dias da indução da doença periodontal. Observou-se aumento significativo das concentrações de IL-6 plasmática, confirmando uma resposta inflamatória sistêmica. Dessa forma, a doença periodontal tem potencial para contribuir significativamente para a resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro, com possibilidade de indução ou perpetuação de efeitos sistêmicos adversos (DARVEAU; TANNER; PAGE, 1997).

Um dos efeitos sistêmicos da inflamação que vem sendo estudado é a ação das citocinas pró-inflamatórias sobre a perda de massa muscular. Uma das citocinas estudada é o TNF- α , que aumenta a adesão de leucócitos nas células endoteliais, atua nos hepatócitos para aumentar a produção de proteínas de fase aguda, induz a ativação dos neutrófilos e inicia a síntese e liberação de outras citocinas inflamatórias, incluindo a IL-1 e IL-6. Dessa forma, o TNF- α , juntamente com a IL-1 e IL-6, desempenha um papel central para iniciar a resposta inata do sistema imunitário humano (REID; LI, 2001; WINKELMAN, 2004).

De Paepe et al. (2008) induziram um processo inflamatório em ratos, causado pela exposição dos animais ao tabaco, e encontraram que níveis elevados de TNF- α promoveram atrofia muscular com apoptose das fibras musculares e alterações no tipo de fibra. Em uma revisão realizada por Winkelman (2004) sobre inatividade e inflamação, foi relatado que, nos músculos, a expressão aumentada de TNF- α provoca miopatia esquelética e disfunção endotelial, que conduz a apoptose dos miócitos e diminuições na massa muscular esquelética levando à fraqueza muscular, com diminuição da força de contração. Desse modo, na presença de inflamação sistêmica, a inatividade pode agravar a destruição de miócitos.

No músculo, durante o processo inflamatório, ocorre aumento da IL-6, que atua como uma quimiocina para que as células produtoras de citocinas sejam recrutadas para as fibras musculares. A IL-6 promove a infiltração de

fatores inflamatórios adicionais nos miócitos, tais como as prostaglandinas, que conduz à proteólise, degeneração e atrofia muscular. Weber-Carstens et al. (2010) relataram que concentrações séricas elevadas de IL-6 são um fator de risco independente para o desenvolvimento da miopatia da doença crítica, pois a IL-6 apresentou uma relação significativa com a inexcitabilidade da membrana muscular. Janssen et al. (2006) administraram IL-6 por sete dias em ratos e encontraram que altas doses dessa interleucina causaram atrofia com redução na área de secção transversa das fibras musculares.

A atrofia e a perda de força muscular são variáveis e dependem de inúmeros fatores incluindo a função fisiológica, composição da fibra muscular, grau de perda de carga e imobilização (BODINE, 2013). Fink et al. (2008) induziram inflamação sistêmica, imobilizaram ratos por 12 dias e observaram que tanto a imobilização quanto a inflamação sistêmica por si só podem reduzir a capacidade de geração de força muscular e a associação desses dois fatores tem efeitos sistêmicos aditivos na fraqueza muscular.

Como discutido anteriormente, a inatividade muscular causada pela imobilização prolongada é um fator de risco determinante para atrofia muscular. Diante do exposto, a presença de uma inflamação sistêmica, com elevação da concentração de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α e IL-6, também se mostra como fator de risco para o desenvolvimento de atrofia e perda de força muscular. Dessa forma, a doença periodontal, com a produção de citocinas pró-inflamatórias e consequente inflamação sistêmica, associada à imobilização prolongada, pode agravar a destruição das fibras musculares, contribuindo para a atrofia muscular e potencializando os efeitos deletérios do imobilismo. Não existem estudos que relacionem a doença periodontal com a perda de massa muscular. Portanto, o desenvolvimento dessa pesquisa se faz necessário para fornecer evidências científicas da associação desses dois fatores com a potencialização da perda de massa muscular em condições de repouso e imobilização prolongada no processo saúde-doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta é uma pesquisa básica, de caráter experimental, com análise de cunho quantitativo e qualitativo (GIL, 2007) e foi realizada no Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos (LELRF) e Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF), vinculados à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *Campus* de Cascavel.

POPULAÇÃO DO ESTUDO E AMOSTRA

Foram utilizados 40 Ratos *Wistar* adultos, pesando em média 260 g e idade média de 8 semanas, provenientes do Biotério Central da UNIOESTE. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do LELRF, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e luz (ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro – 7h – 19h) e receberam água e ração comercial à vontade. Os animais foram randomizados em quatro grupos de 10 animais cada, com base em estudos preliminares (NASSAR et al., 2009) e em cálculo amostral (Teste ANOVA com poder de 99% e nível de alfa de 5%) (Figura 6).

PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS

Os procedimentos para o desenvolvimento da pesquisa foram realizados na sequência do esquema apresentado na Figura 7.

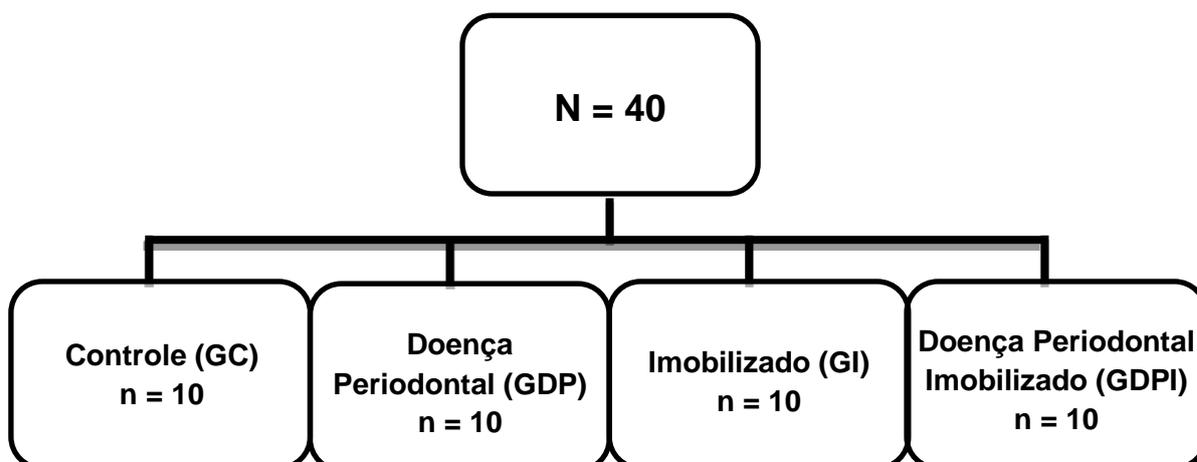


Figura 6 – Randomização dos grupos experimentais.

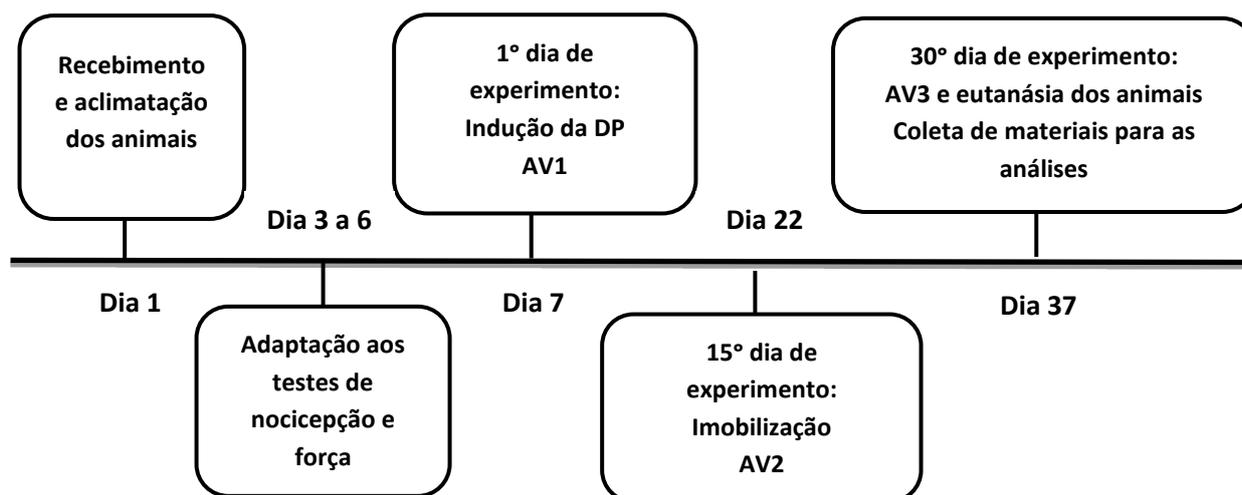


Figura 7 – Procedimentos para coleta de dados, representação da linha de tempo compreendendo os 37 dias de experimento. DP: Doença Periodontal; AV1: Avaliação 1; AV2: Avaliação 2; AV3: Avaliação 3.

INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL

Após 7 dias de aclimação, os animais foram anestesiados (xilazina 0,04 ml/100g e quetamina 0,08 ml/100g) e posicionados em mesa operatória adaptada, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal facilitando o acesso

aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, foi colocado um fio de algodão número 40 ao redor do primeiro molar inferior direito e esquerdo. Essa ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e consequente desenvolvimento da DP (Figura 8) (NASSAR et al., 2009).

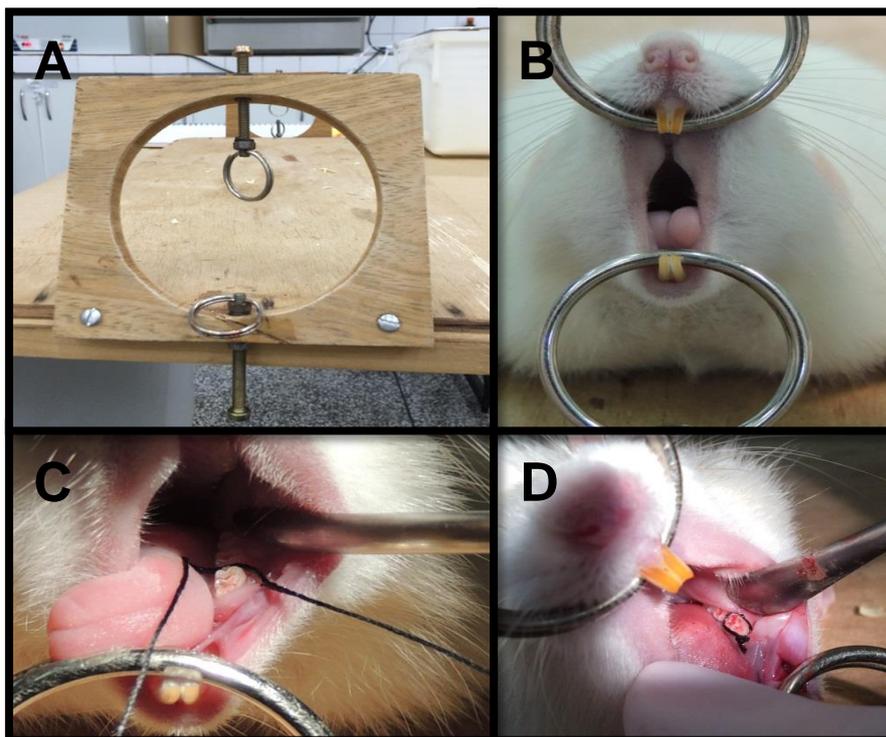


Figura 8 – Indução da Doença Periodontal. A: Mesa operatória adaptada. B: Abertura bucal. C: Colocação da ligadura (fio de algodão 40) no primeiro molar inferior. D: Ligadura ao redor do primeiro molar inferior.

PROTOCOLO DE IMOBILIZAÇÃO

Após 15 dias da indução da doença periodontal, os animais foram anestesiados (xilazina 0,04 ml/100 g e quetamina 0,08 ml/100 g) e imobilizados utilizando um modelo proposto por Carvalho, Shimano e Volpon (2002). Esse modelo foi confeccionado com material próprio para engessar um seguimento corporal, sendo: ligadura de tecido saturada com sulfato de cálcio desidratado (CaSO_4), sob a forma de pó branco, caracterizando uma atadura gessada. Os

animais do grupo GI e GDPI tiveram a órtese moldada a partir da região abdominal, logo abaixo das últimas costelas, seguindo para o membro pélvico direito de cada animal, sendo colocada em toda a extensão do membro de forma que este mantivesse a articulação do joelho em extensão, bem como flexão plantar completa de tornozelo, ou seja, em posição de encurtamento do músculo sóleo. Os animais foram mantidos nessa posição por 15 dias consecutivos (Figura 9) (KUNZ et al., 2014).

A verificação de imobilização foi realizada diariamente pela manhã e foi observada a presença ou não de lesões ou edema de pele. A principal complicação encontrada devido à imobilização foi edema do membro engessado. Nesse caso, o aparato foi retirado e o animal foi mantido livre da imobilização por 24 horas; após esse período, foi refeita a imobilização.

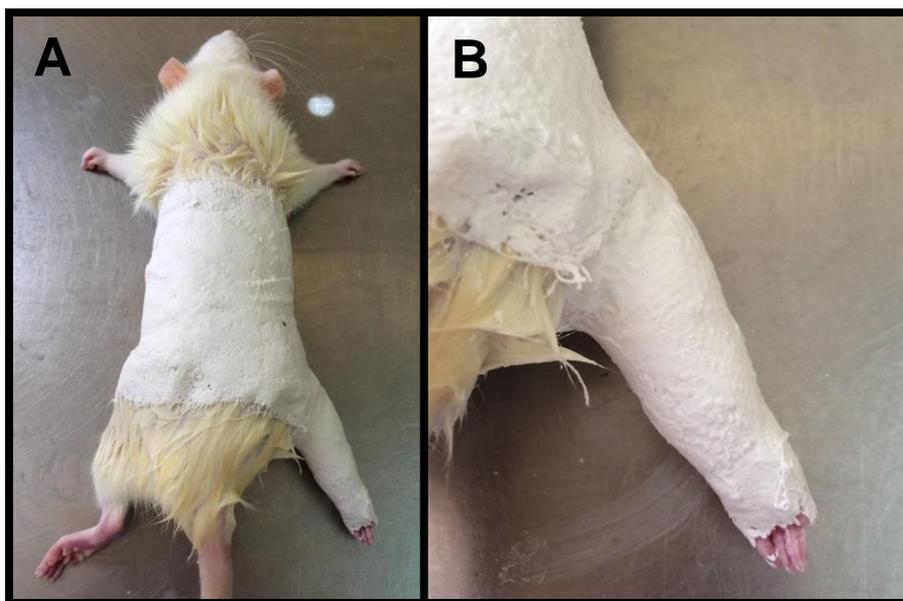


Figura 9 – Aparato de imobilização. A: imobilização em gesso partindo da região abdominal até o membro posterior direito. B: manutenção da extensão do joelho com posição de encurtamento do músculo sóleo (flexão plantar). O aparato pesou 50 gramas.

AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO

Foram realizadas três avaliações de nocicepção. A primeira avaliação (AV1) foi antes da indução da doença periodontal para obter valores de

base; a segunda avaliação (AV2) foi após 15 dias da indução da doença periodontal e antes da imobilização; por fim, a terceira avaliação (AV3) foi realizada após 30 dias de doença periodontal e 15 dias de imobilização. Para facilitar a adaptação dos animais ao instrumento, nos três dias anteriores à AV1, foi realizada uma simulação da avaliação (MARCIOLI et al., 2013).

Para avaliar a nocicepção, foi utilizado um analgesímetro digital, tipo filamento de Von Frey da marca *Insight*® (Ribeirão Preto, São Paulo), que consiste em um braço com uma sonda descartável de polipropileno, com a capacidade de avaliar de 0,1-1000 g, ligado a uma caixa de amplificador, o que permite testar a sensibilidade nociceptiva ao estímulo mecânico em animais. O animal foi colocado em caixas de madeira com tampa de acrílico. A base foi confeccionada em grade metálica vazada, pela qual foi possível inserir o filamento na região plantar do membro pélvico direito do animal. Foi realizada pressão com aumento gradual até o animal retirar o membro e após foi anotado o valor do limiar de retirada. Em cada avaliação, o teste foi repetido três vezes e utilizado o valor médio das repetições, com unidade em gramas-força (gf) (Figura 10) (VIVANCOS et al., 2004).



Figura 10 – Avaliação da Nocicepção. A: Analgesímetro digital tipo filamento de Von Frey, *Insight*® (Ribeirão Preto, São Paulo). B: Animal na caixa, aplicado pressão na região plantar.

AVALIAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR DE PREENSÃO

Para a força muscular, foi utilizado o método de avaliação de força de preensão adaptado do modelo descrito por Bertelli e Mira (1995), em que os animais foram segurados pela cauda permitindo que eles se agarrassem em uma grade ligada a um transdutor de força. Em seguida, os animais foram puxados pela cauda até que eles perdessem a ação de agarrar. Nesse momento, foi avaliada a força máxima do membro pélvico direito, registrada no transdutor. Esse teste foi repetido três vezes e utilizado o valor médio das medidas obtidas. O membro pélvico esquerdo foi contido pelo avaliador impedindo que fosse utilizado no momento em que o animal agarrasse a grade. A primeira avaliação (AV1) foi realizada antes da indução da doença periodontal para obter valores de base; a segunda avaliação (AV2) foi realizada após 15 dias da indução da doença periodontal e antes da imobilização; por fim, a terceira avaliação (AV3) foi realizada após 30 dias de doença periodontal e após 15 dias de imobilização. Três dias antes da primeira avaliação, os animais foram treinados e adaptados em relação ao equipamento (Figura 11) (CORADINI et al., 2015).

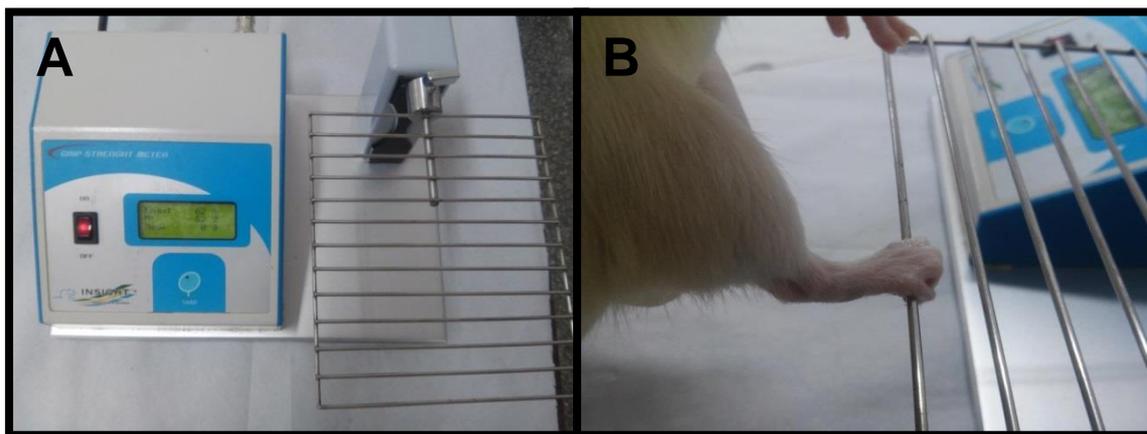


Figura 11 – Avaliação da Força de Preensão. A: Aparelho transdutor de força, registro dos valores obtidos (círculo). B: Ato de agarrar do animal; ao ser puxado, irá gerar a força máxima.

EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Decorridos 30 dias da indução da DP e 15 dias de imobilização, os animais foram pesados e anestesiados com quetamina (95mg/Kg) e xilazina (12mg/Kg), decapitados em guilhotina e foi coletado o músculo sóleo direito para análise morfológica e morfométrica.

ANÁLISE DO MÚSCULO SÓLEO

Comprimento e peso muscular

Após a coleta, o músculo sóleo direito foi dissecado e limpo, pesado em balança analítica para obtenção da massa muscular (em gramas) e fixado em superfície plana, para a mensuração do comprimento muscular máximo em repouso, por meio de paquímetro digital, fornecido em milímetros. Posteriormente, foi dividido longitudinalmente, em duas partes iguais: a metade lateral foi destinada para a contagem do número de sarcômeros em série e a metade medial para o processamento histológico em corte transversal, para a avaliação da morfologia muscular.

Análise morfológica e morfométrica

Para a avaliação morfológica do músculo sóleo, em corte transversal, após a coleta permaneceram em metacarn por 24 horas e foram acondicionados em álcool 70%. Para o processamento histológico, o material foi desidratado em série alcóolica crescente, diafanizado em xilol e incluso em

parafina. Foram realizados cortes, com a utilização de um micrótomo rotativo, na espessura de 7 μm . Depois disso, foram coradas com HE para análise morfológica geral do tecido muscular e em tricrômico de Masson para o tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Posteriormente, foi realizada a leitura em microscópio de luz (BX60 *Olympus*[®], Tóquio, Japão), na objetiva de 40x para descrição morfológica do tecido.

Na análise morfométrica, foram realizadas as seguintes mensurações: área de secção transversa, menor diâmetro da fibra muscular, contagem do número de fibras, núcleos e capilares sanguíneos. Para essas mensurações, foram obtidas 10 imagens na objetiva de 40X; em cada imagem, foram mensuradas 10 fibras pelo programa *Image-Pro Plus 6.0*, totalizando 100 mensurações por animal.

Para determinar a densidade do tecido conjuntivo do endomísio e perimísio, foi utilizado o programa *GIMP* (GNU Programa de Manipulação de Imagens) 2.0 (*GNU General Public License*[®], Berkeley, Califórnia). A área relativa do tecido conjuntivo (densidade de área) foi calculada dividindo o total de pixels da fotomicrografia pelo total de pixels da marcação do tecido conjuntivo.

As fibras musculares, os núcleos e os capilares sanguíneos presentes na fotomicrografia foram morfológicamente identificados, marcados e contabilizados. Para calcular a razão núcleo por fibra e capilar por fibra, foi realizada a divisão do número total de núcleos e capilares pelo total de fibras musculares presentes no mesmo campo visual. Para evitar erro de amostragem, foram excluídas as fibras, núcleos e capilares sanguíneos projetados sobre as bordas superior e esquerda.

Para a contagem do número de sarcômeros, em análise longitudinal, os músculos sóleos permaneceram em formol 10% por três horas. Em seguida, foram colocados em ácido nítrico 30%. Assim que houve a quebra do tecido conjuntivo, foram armazenados em solução de glicerol 50%. Para a preparação das lâminas, o músculo foi colocado em uma placa de Petri e, com auxílio de uma lupa (Micronal), foram isoladas 6 fibras, de tendão a tendão, utilizando uma pinça anatômica fina (12 cm) e montadas em lâminas histológicas contendo esmalte incolor para melhor adesão da fibra. Foram analisadas em microscópio de luz, na objetiva de 40x, fotomicrografadas e digitalizadas para posterior análise no

programa *Image-Pro Plus 6.0* (*Media Cybernetics*®, Silver Spring, USA), no qual foi feita a contagem dos sarcômeros ao longo de 50 μm , em 6 campos não consecutivos, totalizando 300 μm (Figura 12). O cálculo de regra de 3 simples foi utilizado para estimar o total de sarcômeros em série no comprimento total do músculo (COUTINHO et al., 2004; WILLIAMS et al., 1988).

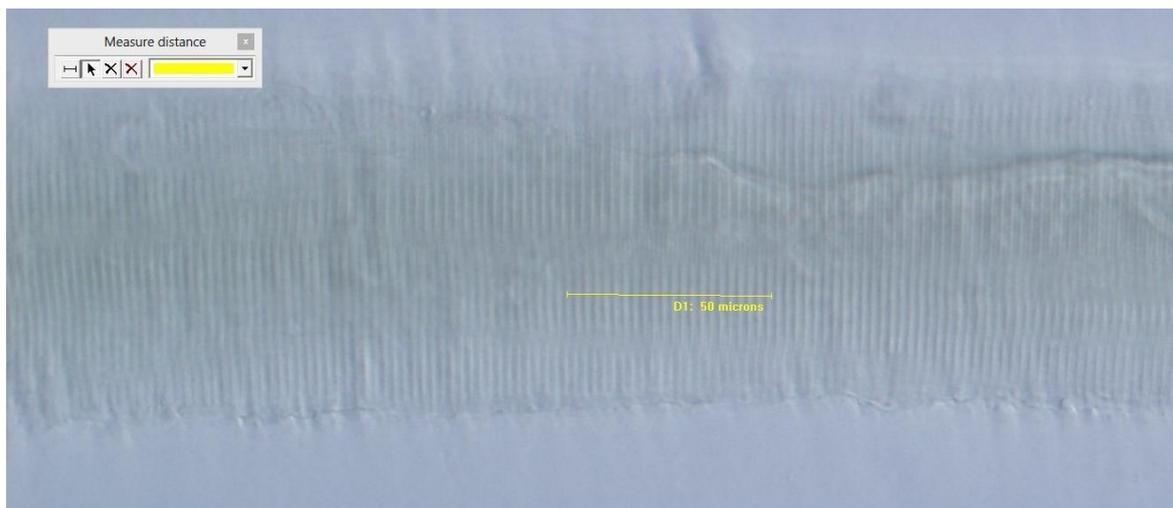


Figura 12 – Fotomicrografia de uma fibra muscular em corte longitudinal, no aumento de 40X, evidenciando os sarcômeros em série. Mensurado 50 μm para contagem do número de sarcômeros.

ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE (Anexo A).

ANÁLISE DOS DADOS

Para avaliação estatística, foi utilizado o programa BioEstat por meio dos testes análise de variância ANOVA de uma via seguida do post test Tukey. O

nível de significância adotado foi $p < 0,05$, sendo os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

Os resultados quantitativos foram apresentados na forma de tabelas, enquanto os resultados sobre a morfologia tecidual foram apresentados em figuras (fotomicrografias) acompanhados da sua descrição e discussão.

RESULTADOS

FORÇA MUSCULAR DE PREENSÃO E NOCICEPÇÃO

Em relação à força muscular de preensão, após 30 dias da indução da DP, na AV3, o GDP apresentou redução significativa da força muscular comparada à AV1. Na AV3, o grupo GI e o grupo GDPI apresentaram força muscular significativamente menor comparada à AV1 e AV2. Quando comparado entre os grupos, na AV3 os grupos GI e GDPI apresentaram força muscular significativamente menor em comparação ao GC e GDP, porém sem diferença estatística entre eles (Tabela 1).

Na avaliação da nocicepção, após 15 dias da indução da DP, na AV2, o GDP reduziu significativamente o limiar de retirada ao estímulo nocivo quando comparado à AV1 e também quando comparado ao GC e GDPI, porém na AV3 esse valor retornou ao basal. O GDPI também apresentou redução significativa desse limiar, porém foi na AV3 em comparação com AV1 e AV2, apresentando também valor significativamente menor quando comparado com os demais grupos (Tabela 2).

Tabela 1 – Valores de Força Muscular de Preensão (gf) de todos os grupos estabelecidos.

Grupos	GC	GDP	GI	GDPI
AV1	31,06 ± 9,8	36,63 ± 11,3 [*]	29,81 ± 10,1 [*]	40,88 ± 7,7 [*]
AV2	30,22 ± 8,5	30,13 ± 4,6 ^{*#}	41,54 ± 13,4 [*]	43,67 ± 13,2 [*]
AV3	27,33 ± 11,9 ^B	24,81 ± 5,9^{#B}	10,50 ± 4,1^{#A}	10,33 ± 5,9^{#A}

GC: Grupo Controle; GDP: Grupo Doença Periodontal; GI: Grupo Imobilizado; GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado. Unidade de medida: grama força (gf). Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos. Símbolos diferentes: Dados estatisticamente diferentes dentro do mesmo grupo (p < 0,05).

Tabela 2 – Valores das avaliações da Nocicepção (gf) do músculo de todos os grupos estabelecidos

GRUPOS	GC	GDP	GI	GDPI
AV1	92,26 ± 11,8	94,37 ± 19,4 [#]	88,07 ± 24,1	94,19 ± 17,1 [*]
AV2	96,67 ± 9,9 ^{AC}	76,87 ± 9,5^{*B}	88,08 ± 14,7 ^{AB}	95,29 ± 10,3 ^{*A}
AV3	92,76 ± 14,4 ^A	98,17 ± 16,5 ^{#A}	83,73 ± 21,2 ^A	47,37 ± 9,0^{#B}

GC: Grupo Controle; GDP: Grupo Doença Periodontal; GI: Grupo Imobilizado; GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado. Unidade de medida: grama força (gf). Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos. Símbolos diferentes: dados estatisticamente diferentes dentro do mesmo grupo (p < 0,05).

PESO CORPORAL, PESO MUSCULAR E COMPRIMENTO MUSCULAR

Em relação ao peso inicial dos animais, o GI apresentou-se significativamente menor em relação ao GDPI. Já aos 30 dias de experimento, os grupos que foram imobilizados (GI e GDPI) apresentaram redução significativa dos pesos em relação aos grupos que não foram imobilizados (GC e GDP). Ao avaliar a evolução desses pesos, foi possível observar que apenas o grupo GDPI não teve aumento significativo do início para o final do experimento (Figura 13).

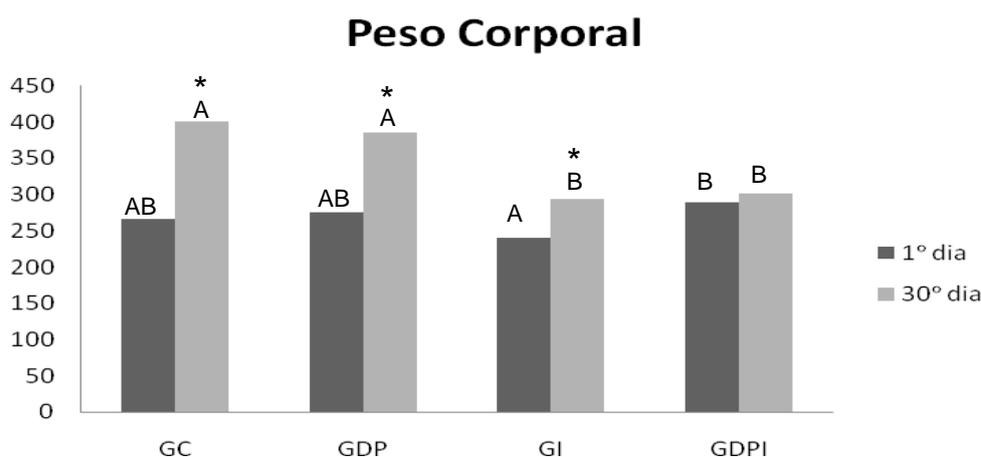


Figura 13 – Evolução do peso corporal dos animais no decorrer dos 30 dias de experimento. GC: Grupo Controle. GDP: Grupo Doença Periodontal, GI: Grupo Imobilizado, GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado (letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos - 1º dia e 30º dia ($p < 0,05$)). * Dados estatisticamente diferentes dentro do mesmo grupo - Teste T-Student ($p < 0,05$).

Em relação ao peso muscular, os grupos GI e GDPI apresentaram valor significativamente menor do que os grupos GC e GDP, não havendo diferença estatística entre eles. Quando avaliado o comprimento muscular, o grupo GDPI apresentou comprimento muscular significativamente menor em comparação ao grupo GC e GDP, porém sem diferença significativa quando comparado ao grupo GI (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores do peso e comprimento muscular de todos os grupos

Grupos	Peso (g)	Comprimento muscular (mm)
GC	$0,24 \pm 0,02^A$	$22,31 \pm 2,0^A$
GDP	$0,22 \pm 0,03^A$	$21,52 \pm 2,5^A$
GI	$0,12 \pm 0,02^B$	$19,68 \pm 1,9^{AB}$
GDPI	$0,10 \pm 0,01^B$	$18,24 \pm 2,3^B$

GC: Grupo Controle; GDP: Grupo Doença Periodontal; GI: Grupo Imobilizado; GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado. Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$).

ESTIMATIVA DO NÚMERO DE SARCÔMEROS E MEDIDAS MORFOMÉTRICAS

Os grupos GI e GDPI apresentaram valores significativamente menores na estimativa do número de sarcômeros em série comparado com o grupo GC (Figura 14).

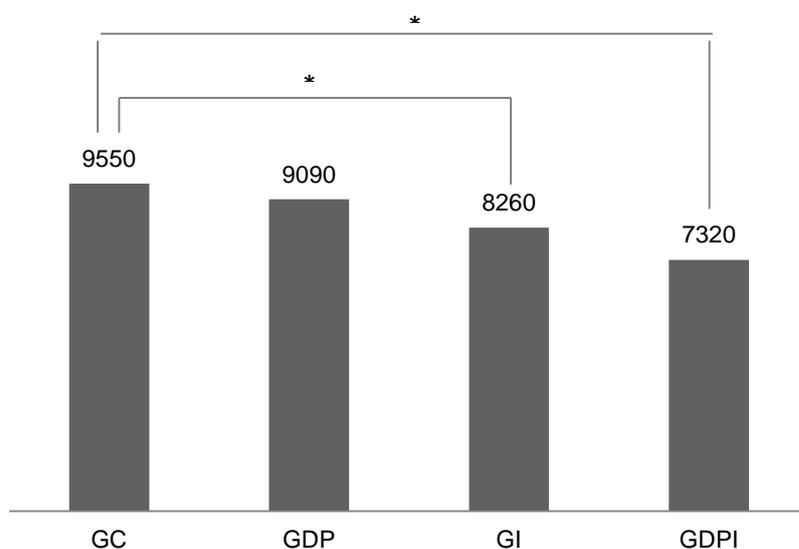


Figura 14 – Estimativa do número de sarcômeros. GC: Grupo Controle; GDP: Grupo Doença Periodontal; GI; Grupo Imobilizado; GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado. Dados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A área de secção transversa reduziu significativamente nos grupos que foram imobilizados, porém, apesar de o grupo GDPI ter diminuído comparado ao grupo GI, não houve diferença significativa; o mesmo ocorreu para análise do menor diâmetro das fibras. Em relação à densidade do tecido conjuntivo, os grupos GDP, GI e GDPI apresentaram aumento significativo do tecido conjuntivo quando comparado ao grupo controle, sendo esse aumento mais expressivo no grupo GDPI, em que a densidade do tecido conjuntivo foi significativamente maior que no grupo GI. Os dados estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 – Área de secção transversa, menor diâmetro e tecido conjuntivo

GRUPOS	Área de Secção Transversa (μm^2)	Menor diâmetro (μm)	Tecido Conjuntivo (%)
GC	3438,42 \pm 267,5 ^A	45,09 \pm 2,7 ^A	1,77 \pm 0,39 ^A
GDP	3251,68 \pm 326,0 ^A	45,90 \pm 1,8 ^A	2,67 \pm 0,23^B
GI	2428,94 \pm 373,9^B	39,16 \pm 3,4^B	4,44 \pm 1,0^C
GDPI	2084,05 \pm 148,3^B	35,81 \pm 1,7^B	6,44 \pm 0,89^D

GC: Grupo Controle; GDP: Grupo Doença Periodontal; GI: Grupo Imobilizado; GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado. Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$).

Nos grupos GI e GDPI, houve aumento significativo na quantidade de núcleos e também na razão núcleo/fibra, comparado ao GC e GDP. Ainda, o GDPI apresentou razão núcleo/fibra significativamente maior quando comparado ao GI, porém sem diferença significativa no número de núcleos (Tabela 5).

Tabela 5 – Total de núcleos e razão núcleo por fibra

Grupos	Nº de núcleos	Razão núcleo/fibra
GC	135,74 \pm 20,5 ^A	3,90 \pm 0,4 ^A
GDP	152,59 \pm 14,0 ^A	4,37 \pm 0,2 ^{AB}
GI	199,82 \pm 11,7^B	5,29 \pm 0,7^B
GDPI	218,61 \pm 12,2^B	6,47 \pm 0,8^C

GC: Grupo Controle; GDP: Grupo Doença Periodontal; GI: Grupo Imobilizado; GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado. Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$).

Em relação aos capilares sanguíneos, os grupos GI e GDPI apresentaram redução significativa no número de capilares quando comparados ao GC, sendo essa redução mais expressiva no GDPI, que apresentou valores significativamente menores em comparação ao GI. A razão capilar/fibra diminuiu significativamente nos grupos DI e GDPI, porém sem diferença significativa entre eles (Tabela 6).

Tabela 6 – Número de capilares e razão capilar por fibra

Grupos	Nº de Capilares	Razão capilar/fibra
GC	17,63 ± 2,5 ^A	0,53 ± 0,09 ^A
GDP	15,79 ± 1,9 ^{AB}	0,49 ± 0,06 ^A
GI	14,37 ± 1,0 ^B	0,36 ± 0,05 ^B
GDPI	12,06 ± 1,3 ^C	0,34 ± 0,05 ^B

GC: Grupo Controle; GDP: Grupo Doença Periodontal; GI: Grupo Imobilizado; GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado. Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$).

ANÁLISE MORFOLÓGICA DO MÚSCULO SÓLEO

O músculo sóleo do grupo controle (GC) apresentou fibras com morfologia normal, de formato poligonal, multinucleadas com núcleos em posição periférica, fascículos bem definidos com organização e estrutura preservada (Figura 15A). No grupo Doença Periodontal (GDP), as fibras também apresentaram, em sua maioria, aspecto normal semelhante ao grupo GC. No entanto, houve aumento no número de núcleos, muitos apresentaram halo basofílico e alguns núcleos com posição central. Também apresentou algumas fibras com formato irregular (Figura 15B). No grupo imobilizado (GI), a morfologia das fibras mostrou-se semelhante ao GDP, com fibras de formato irregular e núcleo de posição central, entretanto com diâmetro menor que o GC e GDP. Ainda, apresentou discreto infiltrado de células inflamatórias no espaço intersticial (Figura 15C). No grupo Doença Periodontal e Imobilizado (GDPI), a associação das duas condições potencializou a degeneração muscular, com a presença de maior número de fibras com formato irregular, núcleos aumentados e alguns com posição central e halo basofílico. Também um grande número de células inflamatórias foi observado no interstício (Figura 15D).

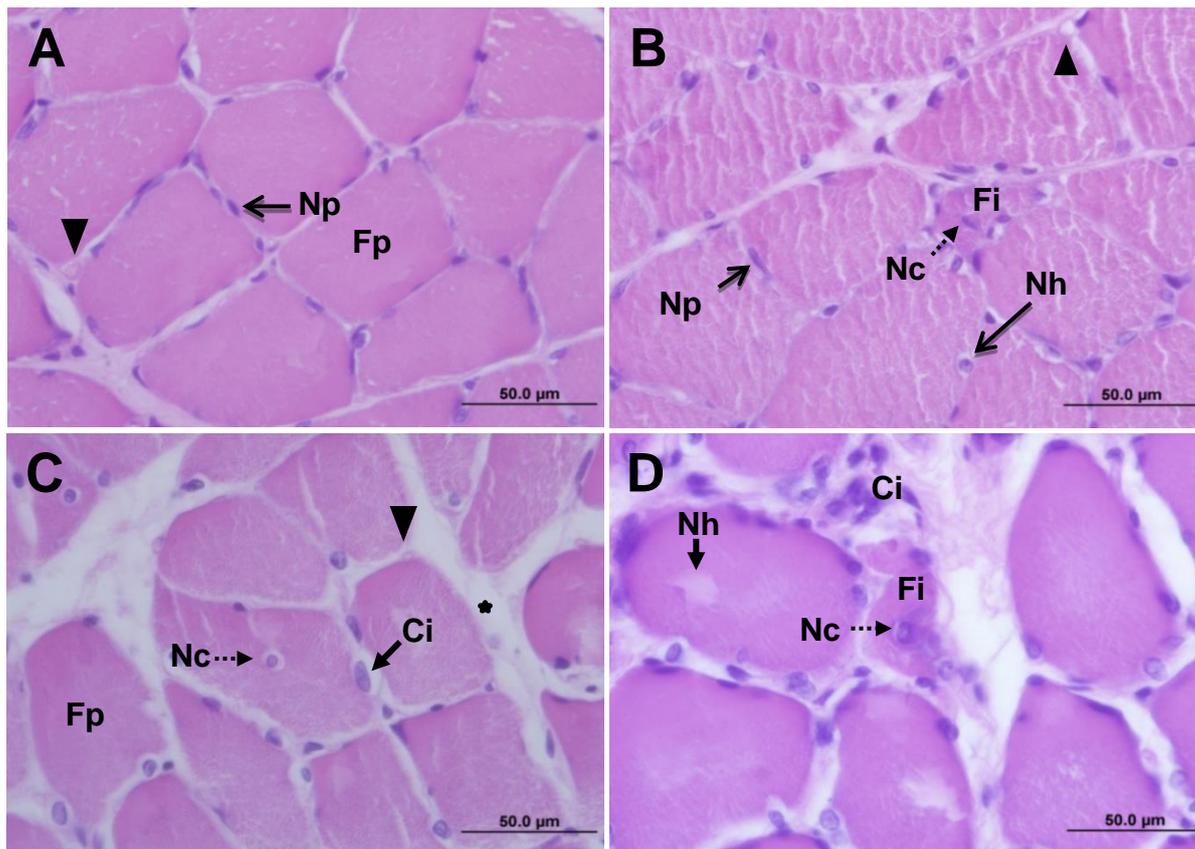


Figura 15 – Fotomicrografias do músculo sóleo de ratos Wistar em secção transversal, coloração HE. **A:** Grupo Controle, evidenciando fibras de aspecto normal com formato poligonal (Fp), núcleo periférico (Np), presença de capilares sanguíneos (cabeça de seta) e tecido conjuntivo com arranjo característico, perimísio (estrela). **B:** Grupo Doença Periodontal com algumas fibras de formato irregular (Fi), aumento do número de núcleos, com alguns de posição central (Nc) e halo basofílico (Nh). **C:** Grupo Imobilizado apresentando células inflamatórias (Ci) **D:** Grupo Doença Periodontal e Imobilizado, com aumento de células inflamatórias (Ci) e fibra com formato irregular (Fi).

Na análise do tecido conjuntivo, os grupos GC e GDP se apresentaram com características e arranjo normal no epimísio, perimísio e endomísio (Figura 16A e B). Nos grupos GI e GDPI, o tecido apresentou arranjo característico, porém apresentou-se aumentado no perimísio e endomísio, com presença de fibroblastos e células inflamatórias. Ainda, essas alterações se mostram mais pronunciadas no GDPI (Figura 16C e D).

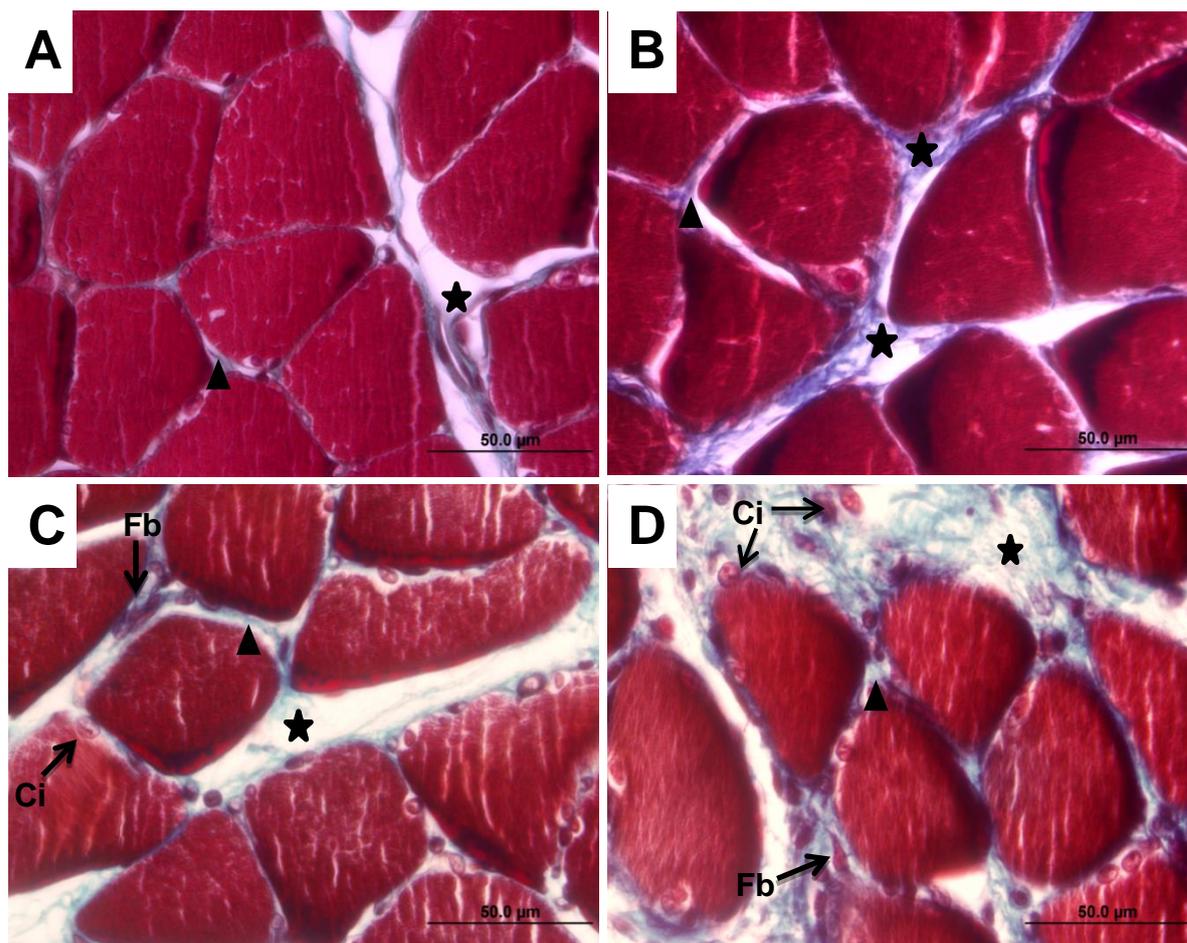


Figura 16 – Fotomicrografias do músculo sóleo de ratos Wistar, em secção transversal, coloração Tricrômico de Masson. **(A)** Grupo Controle e **(B)** Grupo Doença Periodontal evidenciando tecido conjuntivo característico, perimísio (estrela) e endomísio (cabeça de seta) com arranjo normal. **(C)** Grupo Imobilização e **(D)** Grupo Doença Periodontal e Imobilização apresentando aumento do tecido conjuntivo: perimísio (estrela) e endomísio (cabeça de seta), com presença de fibroblastos (Fb) e células inflamatórias (Ci).

DISCUSSÃO

No presente estudo, encontrou-se que a imobilização reduziu o peso e comprimento muscular, a estimativa do número de sarcômeros em série, força muscular e limiar nociceptivo quando comparado aos grupos não imobilizados. Esses achados corroboram com a análise morfológica e morfométrica, em que a imobilização promoveu perda de massa muscular, caracterizada pela redução significativa da área de secção transversa das fibras musculares, redução do menor diâmetro, aumento no número de núcleos e diminuição dos capilares sanguíneos, com aumento significativo de tecido conjuntivo e visível degeneração da fibra muscular.

Os achados do presente estudo estão de acordo com Carvalho et al. (2013). Depois de imobilizar animais por 21 dias, encontraram em análise histológica aumento do tecido conjuntivo, variação do tamanho da fibra e presença de processos degenerativos, bem como diminuição do peso muscular no grupo imobilizado. Konno et al. (2008) imobilizaram animais por 15 dias e também encontraram redução do peso e comprimento muscular e redução do número de sarcômeros em série. Resultados semelhantes foram encontrados recentemente por Silva et al. (2013) e Kunz et al. (2014).

Miyachi e Yamazaki (2015) usaram a suspensão do membro posterior como modelo de atrofia muscular por desuso e os resultados foram semelhantes ao do presente estudo, com diminuição do peso muscular, redução da área de secção transversa e redução da razão capilar/fibra. Dessa forma, as alterações encontradas no presente estudo estão de acordo com a literatura e mostram a eficácia do modelo escolhido para atrofia muscular por desuso,

havendo desestruturação das fibras e tecidos adjacentes, decorrente da ativação dos sistemas proteolíticos, promovendo diminuição de síntese e aumento de degradação de proteínas, que provoca uma adaptação muscular em relação ao seu comprimento, peso, número de unidades contráteis, diminuição do diâmetro das fibras, diminuição no número de capilares e número de núcleos (ZHONG et al., 2005; MIYACHI; YAMAZAKI, 2015; CARVALHO et al., 2013; KONNO et al., 2008).

Essas alterações nos grupos imobilizados estão ligadas ao fato de que na atrofia muscular ocorre um aumento na produção de EROS em relação ao estresse oxidativo (KANAZACHI et al., 2013; KANAZACHI et al., 2014) que atua na ativação dos sistemas calpaína e caspase-3, promovendo a degradação dos sarcômeros, levando à diminuição das unidades contráteis, com consequente redução do comprimento muscular e, também, com a ativação do sistema ubiquitina-proteossoma, que, associado ao sistema de autofagia, promove disfunção celular e degradação das miofibrilas (PIERRE et al., 2016; TALBERT et al., 2013; HUANG; FOSBERG, 1998).

Outro resultado importante do presente estudo foi que a doença periodontal associada à imobilização viabilizou a potencialização dos efeitos deletérios, promovendo, inclusive, a diminuição da força muscular de forma independente, após 15 dias do início do processo inflamatório, bem como quando associada à imobilização. O mesmo resultado foi encontrado para o comprimento muscular e limiar nociceptivo. Esses resultados também são confirmados pela análise morfológica e morfométrica, em que a doença periodontal por si só promoveu aumento significativo da densidade do tecido conjuntivo. Quando associada à imobilização, houve intensificação desse efeito, bem como potencializou a redução de capilares sanguíneos e aumento na razão núcleo/fibra, evidenciados na morfologia pela destruição mais expressiva do tecido muscular.

Até o momento, não foram encontrados estudos que relacionem a doença periodontal com a atrofia muscular por desuso, porém alguns estudos mostram que essa doença tem grande impacto na saúde sistêmica dos indivíduos (NASSAR et al., 2014; BRANDALERO et al., 2012; DO NASCIMENTO et al., 2013; TOREGANI et al., 2016). Oliveira et al. (2015) encontraram que a doença periodontal pode ser considerada um fator de risco para a diminuição do

desempenho físico em indivíduos adultos, o que pode ser explicado pela elevação das citocinas pró-inflamatórias sistêmicas, que podem agir modificando o metabolismo muscular e levar à perda de massa e diminuição da força. Recentemente, Eremenko et al. (2016) encontraram que a doença periodontal está relacionada à perda de força muscular em indivíduos adultos e que essa associação também está relacionada à presença de marcadores inflamatórios. Esses achados estão de acordo com os resultados encontrados no presente estudo e mostram que a doença periodontal tem potencial inflamatório para atingir o sistema muscular esquelético, porém pouco se sabe como ocorrem esses efeitos em indivíduos que necessitam de repouso prolongado, como no caso de pacientes acamados por um longo período de tempo em Unidades de Terapia Intensiva, em estados semivegetativos e vegetativos e também os efeitos no condicionamento físico e sistema osteomioarticular.

Caron et al. (2009) mostraram que, durante o processo de atrofia muscular, ocorre aumento nas concentrações de TNF- α e interleucinas. O mesmo ocorre durante o curso da doença periodontal (LIAO et al., 2014; DA COSTA et al., 2015). Dessa forma, a elevação da concentração de citocinas inflamatórias sistêmicas pela DP parece ser um caminho plausível para justificar a potencialização dos efeitos deletérios da imobilização encontrados no presente estudo (OLIVEIRA et al., 2015). No entanto, os possíveis mecanismos envolvidos e qual via é ativada para promover atrofia muscular associada à inflamação pela doença periodontal devem ainda ser elucidados.

O músculo esquelético expressa receptores para o TNF- α (WINKELMAN, 2004). Durante o processo inflamatório, por essa citocina estar aumentada sistemicamente, ocorre maior ligação aos seus receptores no sarcolema, estimulando a produção de EROS pela mitocôndria, que promove a perda de força muscular por alteração na função dos miofilamentos e aumenta a expressão de proteínas na via ubiquitina-proteossoma, gerando maior degradação e destruição de proteínas contráteis (REID; LI, 2001). Li et al. (2005) mostram que, além de o TNF- α estimular a produção de EROS, essa citocina é capaz de atuar diretamente no aumento da expressão de genes do sistema ubiquitina-proteossoma, promovendo a perda de massa muscular. Resultados semelhantes foram encontrados recentemente por Lin et al. (2016). Dessa forma,

a ativação da proteólise muscular está associada às citocinas inflamatórias e estresse oxidativo (QUINTANA et al., 2015).

A ativação dos sistemas proteolíticos durante a atrofia pelo estresse oxidativo e também pelo processo inflamatório ocorre nos primeiros dias de imobilização. No processo de atrofia muscular, estudos mostram que há diminuição do número de núcleos que leva à diminuição do tamanho da fibra (ZHONG et al., 2005; FERREIRA et al., 2004). Porém, no presente estudo, houve aumento do número de núcleos e razão núcleo/fibra observado no grupo imobilizado, que pode ser justificado pela presença de infiltrado inflamatório e também pela proliferação de células satélites (CARON et al., 2009; SLIMANI et al., 2012). É evidente que o processo inflamatório local desencadeado pela imobilização gera efeitos deletérios e esses efeitos se mostram ainda mais intensos na presença de uma inflamação sistêmica, uma vez que, no grupo imobilizado associado à doença periodontal, a razão núcleo/fibra foi significativamente maior.

O aumento do estresse oxidativo, no processo de atrofia muscular, também está relacionado à redução dos capilares sanguíneos, promovendo diminuição do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que é responsável pela proliferação das células endocapilares (KANAZACHI et al., 2013; KANAZACHI et al., 2014). No presente estudo, a quantidade de capilares sanguíneos foi significativamente menor no grupo GDPI comparado ao GI, indicando que, devido ao processo inflamatório ser mais intenso, ocorreu um aumento mais expressivo do estresse oxidativo com consequente potencialização na redução da vascularização.

Na atrofia do músculo esquelético, ocorre aumento do tecido conjuntivo, com consequente aumento na síntese de colágeno tipo I e diminuição da sua degradação, o que promove maior rigidez ao tecido levando à perda da elasticidade com consequentes alterações funcionais (FERNANDES et al., 2005; SLIMANI et al., 2012). Foi possível observar, no presente estudo, que nos grupos GDP, GI e GDPI houve aumento significativo do tecido conjuntivo em comparação ao grupo controle. No grupo GDPI, observou-se que a densidade do tecido conjuntivo foi significativamente maior em comparação ao grupo GI; no grupo GDP, houve aumento do tecido conjuntivo comparado com o grupo controle.

Quintana et al. (2015) encontraram que elevadas concentrações de TNF- α e EROS promoveram atrofia muscular com aumento do tecido conjuntivo. Dessa forma, o aumento do tecido conjuntivo no grupo GDP e sua potencialização no grupo GDPI podem estar relacionados com o aumento de mediadores inflamatórios pela doença periodontal. Esses achados indicam a presença de fibrose muscular, o que promove alteração na funcionalidade (CARVALHO et al., 2013), demonstrada pela redução da força muscular de preensão nos respectivos grupos.

Em relação ao limiar nociceptivo, o grupo GI não apresentou redução após o período de imobilização, o que vai contra os resultados encontrados por Chuganji et al. (2015), em que houve redução desse limiar, caracterizado por hiperalgesia induzida pela imobilização. Contudo, esses animais foram imobilizados por 8 semanas. A imobilização causa alterações no limiar nociceptivo e aumento nas concentrações de TNF- α em animais que ficaram 4 semanas imobilizados e tinham associado fratura de tíbia (GUO et al., 2014). No presente estudo, os animais ficaram 15 dias imobilizados. No grupo GDPI, houve redução significativa do limiar nociceptivo; entretanto, no grupo GI, isso não ocorreu, mostrando que 15 dias de imobilização podem não ter sido suficientes para induzir alterações no limiar nociceptivo. Porém, esse fator associado a uma condição de inflamação (GDPI) conseguiu promover alterações significativas. Segundo Abramova, Kozlov e Pertsov (2014) e Teixeira (2001), isso pode ser justificado pela diminuição do limiar nociceptivo em resposta à presença de citocinas.

No presente estudo, não foi possível realizar a dosagem das concentrações dos marcadores inflamatórios, porém é conhecido que a inflamação sistêmica promove perda de massa muscular (VOISIN et al., 1996; BREUILLE et al., 1998; ROSSIGNOL et al., 2008; AHLBECK et al., 2009; Z'GRAGGEN et al., 2011; LANGHANS et al., 2014). Dessa forma, as características descritas pelos estudos supracitados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, estando mais evidentes na associação da DP com a imobilização.

Inúmeros mecanismos podem estar envolvidos na potencialização da atrofia muscular, decorrente da inflamação sistêmica causada pela doença

periodontal. O que nossos resultados mostram é que existe potencialização desses efeitos deletérios da imobilização do músculo esquelético; contudo, este é o primeiro estudo que mostra a associação desses dois fatores. Ainda, esta pesquisa é pioneira em demonstrar os efeitos morfológicos e funcionais da DP associada à imobilização no músculo esquelético. Dessa forma, mais pesquisas devem ser realizadas para dar continuidade à elucidação dos mecanismos envolvidos com essas alterações, bem como buscar outras alterações funcionais e morfológicas relacionadas à doença periodontal e ao tecido muscular esquelético, com objetivo de entender essas interações e elaborar medidas preventivas que atendam os indivíduos que necessitem de imobilização ou repouso prolongado e são portadores da doença periodontal, a fim de minimizar esses efeitos deletérios.

CONCLUSÃO

A doença periodontal potencializou os efeitos deletérios da imobilização do músculo estriado esquelético, por meio da intensa degeneração do tecido muscular, com significativo aumento do tecido conjuntivo, da razão núcleo/fibra e presença de infiltrado inflamatório, significativa diminuição da vascularização e redução do comprimento muscular, com conseqüente redução da força muscular e limiar nociceptivo.

REFERÊNCIAS

ABRAMOVA, A. Y.; KOZLOV, A. Y.; PERTSOV, S. S. Dynamics of changes in nociceptive reactions of rats after peripheral administration of lipopolysaccharide. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 157, n. 4, p. 413-415, ago. 2014.

AHLBECK, K. et al. Signs of critical illness polyneuropathy and myopathy can be seen early in the ICU course. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, Oxford, v. 53, n. 6, p. 717-723, jul. 2009.

ALFAKRY, H. et al. Neutrophil proteolytic activation cascades: a possible mechanistic link between chronic periodontitis and coronary heart disease. **Innate Immunity**, Los Angeles, v. 22, n. 1, p. 85-99, jan. 2016.

BELIBASAKIS, G. N.; BOSTANCI, N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 39, n. 3, p. 239-248, mar. 2012.

BERTELLI, J. A.; MIRA, J. C. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 58, n. 1-2, p. 151-155, maio 1995.

BERTHON, P. et al. Regulation of ubiquitin–proteasome system, caspase enzyme activities, and extracellular proteinases in rat soleus muscle in response to unloading. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, Berlin, v. 454, n. 4, p. 625-633, maio 2007.

BODINE, S. C. Disuse-induced muscle wasting. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 45, n. 10, p. 2200-2208, out. 2013.

BONALDO, P.; SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Disease Models & Mechanisms**, Cambridge, v. 6, n. 1, p. 25-39, jan. 2013.

BRANDELERO JR, S. et al. Decreased TNF- α gene expression in periodontal ligature in MSG-obese rats: a possible protective effect of hypothalamic obesity against periodontal disease? **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 300-306, maio 2012.

BREUILLE, D. et al. Sustained modifications of protein metabolism in various tissues in a rat model of long-lasting sepsis. **Clinical Science**, London, v. 94, n. 4, p. 413-423, abr. 1998.

BRITO, L. C. W. et al. Experimental periodontitis promotes transient vascular inflammation and endothelial dysfunction. **Archives of Oral Biology**, New York, v. 58, n. 9, p. 1187-1198, set. 2013.

BROOKS, N. E.; MYBURGH, K. H. Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 5, n. 99, p. 1-14, mar. 2014.

CARMELI, E.; HAIMOVITCH, T. G.; NEMCOVSKY, C. E. Expression of matrix metalloproteinase 2 and heat shock protein-72 in immobilized muscle in rats. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, Kifissia, v. 6, n. 1, p. 96-102, jan./mar. 2006.

CARON, A. Z. et al. A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. **Journal of applied physiology (1985)**, Bethesda, v. 106, n. 6, p. 2049-2059, jun. 2009.

CARVALHO, C. M. M.; SHIMANO, A. C.; VOLPON, J. B. Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 65-73, maio/ago. 2002.

CARVALHO, M. M. et al. Análise morfométrica dos efeitos da imobilização sobre o músculo gastrocnêmio de ratos. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, DF, v. 11, n. 2, p. 99-106, jul./dez. 2013.

CHO, S. H.; KIM, J. H.; SONG, W. In vivo rodent models of skeletal muscle adaptation to decreased use. **Endocrinology and Metabolism**, v. 31, n. 1, p. 31-37, mar. 2016.

CHUGANJI, S. et al. Hyperalgesia in an immobilized rat hindlimb: effect of treadmill exercise using non-immobilized limbs. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 584, p. 66-70, jan. 2015.

CORADINI, J. G. et al. Evaluation of grip strength in normal and obese Wistar rats submitted to swimming with overload after median nerve compression. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 43-47, jan./fev. 2015.

- CORNACHIONE, A. S. et al. Effects of eccentric exercise in rehabilitation of phasic and tonic muscles after leg immobilization in rats. **Acta Histochemica**, Germany, v. 116, n. 8, p. 1216-1224, out. 2014.
- COUTINHO, E. L. et al. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 37, n. 12, p.1853-1861, dez. 2004.
- CRAIG, R. G. et al. Periodontal Diseases and Systemic Inflammation. **Seminars in Dialysis**, Cambridge, v. 26, n. 1, p. 16-39, jan./fev. 2013.
- CUTLER, C. W.; JOTWANI, R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. **Periodontology 2000**, Malden, v. 35, n. 1, p. 135-157, jun. 2004.
- DA COSTA, T. A. et al. Inflammation biomarkers of advanced disease in nongingival tissues of chronic periodontitis patients. **Mediators of Inflammation**, mar. 2015
- DARVEAU, R. P.; TANNER, A.; PAGE, R. C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontology 2000**, Malden, v. 14, p. 12-32, jun. 1997.
- DE LETTER, M. A. et al. Risk factors for the development of polyneuropathy and myopathy in critically ill patients. **Critical Care Medicine**, Philadelphia, v. 29, n. 12, p. 2281-2286, dez. 2001.
- DE PAEPE, B. et al. TNF- α receptor genotype influences smoking-induced muscle-fibre-type shift and atrophy in mice. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 115, n. 2, p. 675-681, fev. 2008.
- DO NASCIMENTO, C. M. et al. Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal disease. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: Targets and Therapy. [electronic resource]**, Auckland, v. 7, n. 6, p. 365-370, out. 2013.
- EREMENKO, M. et al. Cross-sectional association between physical strength, obesity, periodontitis and number of teeth in a general population. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 43, n. 5, p. 401-407, maio 2016.
- FANZANI, A. et al. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, Heidelberg, v. 3, n. 3, p. 163-179, set. 2012.
- FERNANDES, K. C. B. G. et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 9, n. 2, p. 235-241, 2005.
- FERREIRA, R. et al. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, Porto, v. 4, n. 3, p. 94-111, jul./dez. 2004.

FINK, H. et al. Systemic inflammatory response syndrome increases immobility-induced neuromuscular weakness. **Critical Care Medicine**, Philadelphia, v. 36, n. 3, p. 910-916, mar. 2008.

GARLET, G. P. et al. The Role of Chemokines and Cytokines in the Pathogenesis of Periodontal and Periapical Lesions: Current Concepts. In: KHATAMI, M. **Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Basis**. Rijeka: InTech, mar. 2012. Cap. 10, p. 219-264.

GARLET, G. P. et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. **Oral Microbiology Immunology**, Copenhagen, v. 21, n. 1, p. 12-20, fev. 2006.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 426p.

GIANNELLI, G. et al. Matrix metalloproteinase imbalance in muscle disuse atrophy. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 20, n. 1, p. 99-106, jan. 2005.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2007. 175 p.

GUO, T. Z. et al. Immobilization contributes to exaggerated neuropeptide signaling, inflammatory changes, and nociceptive sensitization after fracture in rats. **The journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society**, Philadelphia, v. 15, n. 10, p. 1033-1045, out. 2014.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. São Paulo: Elsevier, 2006.

HADDAD, F. et al. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. **Journal of Applied Physiology (1985)**, Bethesda, v. 98, n. 3, p. 911-917, mar. 2005.

HASTURK, H.; KANTARCI, A.; VAN DYKE, T. E. Oral inflammatory diseases and systemic inflammation: role of the macrophage. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 3, n. 118, maio 2012.

HUANG, J.; FORSBERG, N. E. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 21, p. 12100-12105, out. 1998.

IONEL, A. et al. Histopathological and clinical expression of periodontal disease related to the systemic inflammatory response. **Histology and histopathology**, Murcia, 2016.

JANSSEN, S. P. M. et al. Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats. **Circulation**, Dallas, v. 111, n. 8, p. 996-1005, mar. 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2013.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

KANAZASHI, M. et al. Protective effects of astaxanthin on capillary regression in atrophied soleus muscle of rats. **Acta Physiologica**, Oxford, v. 207, n. 2, p. 405-415, fev. 2013.

KANAZASHI, M. et al. Amelioration of capillary regression and atrophy of the soleus muscle in hindlimb-unloaded rats by astaxanthin supplementation and intermittent loading. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 99, n. 8, p. 1065-1077, ago. 2014.

KHALAF, H.; LÖNN, J.; BENGTSSON, T. Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: possible role for TGF- β 1 as a marker for disease progression. **Cytokine**, Oxford, v. 67, n. 1, p. 29-35, maio 2014.

KONNO, E. A. B. et al. Remobilização por alongamento estático cíclico em músculo sóleo de ratos imobilizados em encurtamento. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 122-125, mar./abr. 2008.

KUNZ, R. I. et al. Effects of immobilization and remobilization on the ankle joint in *Wistar* rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 47, n. 10, p. 842-849, out. 2014.

LANG, C. H.; FROST, R. A.; VARY, T. C. Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 293, n. 2, p. E453-E459, ago. 2007.

LANGHANS, C. et al. Inflammation-induced acute phase response in skeletal muscle and critical illness myopathy. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e92048, mar. 2014.

LEISHMAN, S. J.; SEYMOUR, G. J.; FORD, P. J. Local and systemic inflammatory responses to experimentally induced gingivitis. **Disease Markers**, New York, v. 35, n. 5, p. 543-549, out. 2013.

LI, Y. P. et al. TNF- α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 19, n. 3, p. 362-370, mar. 2015.

LIAO, C. H. et al. Expression and distribution of TNF- α and PGE₂ of periodontal tissues in rat periodontitis model. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Heidelberg, v. 7, n. 5, p. 412-416, maio 2014.

LIN, S. Y. et al. Skeletal muscle proteolysis is associated with sympathetic activation and TNF- α -ubiquitin-proteasome pathway in liver cirrhotic rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Melbourne, v. 31, n. 4, p. 890-896, abr. 2016.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontologia clínica e implantologia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LÖE, H. Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. **International Dental Journal**, Malden, v. 50, n. 3, p. 129-139, jun. 2000.

LORENCINI, M. et al. Changes in MMPs and inflammatory cells in experimental gingivitis. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 24, n. 2, p. 157-166, fev. 2009.

LOWE, J. S.; ANDERSON, P. G. **Stevens & Lowe's human histology**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier, 2014.

MARCIOLI, M. A. R. et al. Nociceptive and histomorphometric evaluation of neural mobilization in experimental injury of the median nerve. **The Scientific World Journal**, p. 1-6, 2013.

MINAMOTO, V. B. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. **Fisioterapia e Pesquisa**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 50-55, 2005.

MIYACHI, R.; YAMAZAKI, T. Effects of static interventions on disuse atrophy of the rat soleus muscle at different sites along its longitudinal axis. **Journal of Physical Therapy Science**, Japan, v. 27, n. 7, p. 2317-2321, jul. 2015.

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

NASSAR, C. A. et al. The effect of resin composites and polishing procedure on periodontal tissue parameters in patients with Diabetes Mellitus. **The European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry**, Larkfield, v. 22, n. 4, p. 146-151, dez. 2014.

NATURE. Disponível em:

<<http://www.nature.com/nrg/journal/v13/n8/images/nrg3228-f2.jpg>>. Acesso em: 23 maio 2016.

OCHALA, J. et al. Preferential skeletal muscle myosin loss in response to mechanical silencing in a novel rat intensive care unit model: underlying mechanisms. **The Journal of Physiology**, Oxford, v. 15, n. 589, p. 2007-2026, abr. 2011.

OFFENBACHER, S.; BARROS, S. P.; BECK, J. D. Rethinking periodontal inflammation. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 79, n. 8, Suppl, p. 1577-1584, ago. 2008.

OLIVEIRA, J. A. P. et al. Periodontal disease as a risk indicator for poor physical fitness: a cross-sectional observational study. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 86, n. 1, p. 44-52, jan. 2015.

PAIXÃO, A. P. S. **Morfometria dos músculos sóleo e gastrocnêmio após imobilização na posição encurtada do membro pélvico de ratos, durante 15, 30 e 45 dias**. 2011. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

PIERRE, N. et al. From physical inactivity to immobilization: dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin resistance and atrophy. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 98, p. 197-207, set. 2016.

POULSEN, J. B. et al. Effect of transcutaneous electrical muscle stimulation on muscle volume in patients with septic shock. **Critical Care Medicine**, Philadelphia, v. 39, n. 3, p. 456-461, mar. 2011.

POULSEN, J. B. Impaired physical function, loss of muscle mass and assessment of biomechanical properties in critical ill patients. **Danish Medical Journal**, Copenhagen, v. 59, n. 11, p. B4544, nov. 2012.

POWERS, S. K.; KAVAZIS, A. N.; MCCLUNG, J. M. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. **Journal of Applied Physiology (1985)**, Bethesda, v. 102, n. 6, p. 2389-2397, jun. 2007.

QUINTANA, H. T. et al. Temporal study following burn injury in young rats is associated with skeletal muscle atrophy, inflammation and altered myogenic regulatory factors. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society**, Basel, v. 64, n. 1, p. 53-62, jan. 2015.

RAMSEIER, C. A. et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 80, n. 3, p. 436-446, mar. 2009.

REID, M. B.; LI, Y. P. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, Oxford, v. 171, n. 3, p. 225-232, mar. 2001.

ROSSIGNOL, B. et al. Effects of chronic sepsis on contractile properties of fast twitch muscle in an experimental model of critical illness neuromyopathy in the rat. **Critical Care Medicine**, Philadelphia, v. 36, n. 6, p. 1855-1863, jun. 2008.

SAĞLAM, M. et al. Effect of sumac extract on serum oxidative status, RANKL/OPG system and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 23, n. 1, p. 33-41, jan./fev. 2015.

SCHOSER, B. G. H.; BLOTTNER, D.; STUERENBURG, H. J. Matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies: enhanced immunoreactivity near atrophic myofibers. **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 105, n. 4, p. 309-313, abr. 2002.

SEABRA, F. R. G. **Análise imuno-histoquímica das metaloproteínases da matriz (mmp-1, mmp-2 e Mmp-9) na doença periodontal**. 2006. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

SILVA, M. D. P.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Minas Gerais, v. 36, p. 21-31, jul. 2007.

SILVA, L. I. et al. Avaliação de parâmetros histomorfométricos em sóleos de ratos submetidos à remobilização por salto em meio aquático. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 219-222, maio/jun. 2013.

SLIMANI, L. et al. The worsening of tibialis anterior muscle atrophy during recovery post-immobilization correlates with enhanced connective tissue area, proteolysis, and apoptosis. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 303, n. 11, p. E1335-E1347, dez. 2012.

TALBERT, E. E. et al. Calpain and caspase-3 play required roles in immobilization-induced limb muscle atrophy. **Journal of Applied Physiology (1985)**, Bethesda, v. 114, n. 10, p. 1482-1489, maio 2013.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM e Dor Orofacial**, Curitiba, v. 1, n. 4, p. 329-334, out./dez. 2001.

TOREGEANI, J. F. et al. Evaluation of periodontitis treatment effects on carotid intima-media thickness and expression of laboratory markers related to atherosclerosis. **General Dentistry**, Chicago, v. 64, n. 1, p. 55-62, jan./fev. 2016.

TSUJINAKA, T. et al. Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 97, n. 1, p. 244-249, jan. 1996.

UM, Y. et al. The influence of diabetes mellitus on periodontal tissues: a pilot study. **Journal of Periodontal & Implant Science**, Seoul, v. 40, n. 2, p. 49-55, abr. 2010.

VETTORE, M. V.; MARQUES, R. A. A.; PERES, M. A. Desigualdades sociais e doença periodontal no estudo SBBrazil 2010: abordagem multinível. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 47, Supl. 3, p. 29-39, dez. 2010.

VIVANCOS, G. G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 391-399, mar. 2004.

VOISIN, L. et al. Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 97, n. 7, p. 1610-1617, abr. 1996.

WEBER-CARSTENS, S. et al. Risk factors in critical illness myopathy during the early course of critical illness: a prospective observational study. **Critical Care**, London, v. 14, n. 3, p. R119, jun. 2010.

WILLIAMS, P. E. et al. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. **Journal of Anatomy**, London, v. 158, p. 109-114, jun. 1988.

WINKELMAN, C. Inactivity and inflammation: selected cytokines as biologic mediators in muscle dysfunction during critical illness. **AACN Clinical Issues**, Hagerstown, v. 15, n. 1, p. 74-82, jan./mar. 2004.

ZAMIR, O. et al. Evidence that tumor necrosis factor participates in the regulation of muscle proteolysis during sepsis. **Archives of Surgery**, Chicago, v. 127, n. 2, p. 170-174, fev. 1992.

Z'GRAGGEN, W. J. et al. Muscle membrane dysfunction in critical illness myopathy assessed by velocity recovery cycles. **Clinical Neurophysiology**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 834-841, abr. 2011.

ZHAO, X. H. et al. Influence of 14-day hind limb unloading on isolated muscle spindle activity in rats. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, London, v. 31, n. 3, p. 155-161, set. 2010.

ZHAO, Y. et al. Psychological stress delays periodontitis healing in rats: the involvement of basic fibroblast growth factor. **Mediators of Inflammation**, Oxford, v. 2012, p. 1-13, 2012.

ZHONG, H. et al. Effects of inactivity on fiber size and myonuclear number in rat soleus muscle. **Journal of Applied Physiology (1985)**, Bethesda, v. 99, n. 4, p. 1494-1499, out. 2005.

ARTIGO CIENTÍFICO

**PERIODONTITE EXPERIMENTAL NA POTENCIALIZAÇÃO DOS
EFEITOS DO IMOBILISMO NO MÚSCULO ESTRIADO
ESQUELÉTICO**

**PERIODONTITE EXPERIMENTAL NA POTENCIALIZAÇÃO DOS EFEITOS DO IMOBILISM
NO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO**

Marcela Aparecida Leite^a, Tatiane Morgenstern de Mattia^a, Camila Mayumi Kakihata^a, Bruna Martinazzo Bortolini^b, Pedro Henrique de Carli Rodrigues^b, Gladson Ricardo Flor Bertolini, Dr^c; Rose Meire Costa Brancalhão, Dra^c; Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, Dra^c; Carlos Augusto Nassar, Dr^c; Patrícia Oehlmeyer Nassar, Dra^c.

^a Discente do Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

^b Discente do Curso de Odontologia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

^c Docente do Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Autor Correspondente

Marcela Aparecida Leite

Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional, Mestrado em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Rua Universitária, nº 2069, Jardim Universitário, CEP 85819-110, Cascavel, PR, Brasil

Telefone: +5545999645092

E-mail: mar.leite@outlook.com

RESUMO

Objetivo: Avaliar se a doença periodontal, por meio da inflamação sistêmica, potencializa os efeitos deletérios da imobilização do músculo estriado esquelético, colaborando para o desenvolvimento da atrofia muscular por desuso. **Metodologia:** Foram utilizados 40 ratos Wistar, divididos em quatro grupos: 1) Grupo Controle (GC); 2) Doença Periodontal (GDP); 3) Imobilizado (GI); 4) Doença Periodontal Imobilizado (GDPI). A doença periodontal foi induzida pelo método de ligadura, durante 30 dias, e a imobilização do membro pélvico direito foi realizada com atadura gessada, por 15 dias. Antes da eutanásia, foram avaliados o limiar nociceptivo e força muscular de preensão. Após, o músculo sóleo foi dissecado e processado para contagem de sarcômeros e análise morfológica e morfométrica. Para análise dos dados, foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguida do post test Tukey, com $p < 0,05$. **Resultados:** Os grupos GI e GDPI apresentaram menor peso muscular, força muscular de preensão e número de sarcômeros comparados ao GC. O GDP apresentou redução da força muscular e do limiar nociceptivo após 15 dias de doença periodontal e aumento de tecido conjuntivo comparado ao GC. O GDPI apresentou menor comprimento muscular e limiar nociceptivo comparados aos demais grupos. O GI apresentou redução da área de secção transversa e menor diâmetro, aumento no número de núcleos e razão núcleo/fibra, diminuição no número de capilares e razão capilar/fibra, com aumento de tecido conjuntivo. No grupo GDPI, houve resultados significativos para aumento da razão núcleo/fibra, diminuição de capilares e aumento de tecido conjuntivo quando comparado ao grupo GI. O grupo GDPI apresentou maior degeneração do tecido muscular e aumento de células inflamatórias em comparação aos outros grupos. **Conclusão:** A doença periodontal potencializou os efeitos deletérios da imobilização do músculo estriado esquelético, por meio da intensa destruição do tecido muscular, com significativo aumento do tecido conjuntivo, da razão núcleo/fibra e infiltrado inflamatório, significativa diminuição da vascularização e redução do comprimento muscular, com consequente redução da força muscular e limiar nociceptivo.

Palavras-chave: Periodontite. Inflamação. Imobilização. Atrofia muscular.

GENERAL ABSTRACT

Objective: To evaluate whether periodontal disease, through systemic inflammation, can potentiate the deleterious effects of immobilization of the skeletal striated muscle, contributing to the development of muscle atrophy due to disuse. **Methods:** Forty Wistar rats were divided into four groups: 1) Control Group (CG), 2) Periodontal Disease (GPD) 3) Immobilized (IG) and 4) Immobilized with Periodontal Disease (IPDG). Periodontal disease was induced for 30 days, with ligature method, and the immobilization of the right pelvic limb was performed with cast bandage for 15 days. Prior to euthanasia, the nociceptive threshold and muscular grasping force were evaluated. Afterwards, the soleus muscle was dissected and processed for sarcomere counting and morphological and morphometric analysis. For analysis of the data, the one-way ANOVA followed by the Tukey post test was used, with $p < 0.05$. **Results:** The IG and IPDG groups presented lower muscle weight, lower muscular grip strength and less number of sarcomeres compared to CG. The PDG showed reduction of muscle strength and nociceptive threshold after 15 days of periodontal disease and increase of connective tissue compared to CG. The IPDG presented lower muscle length and nociceptive threshold compared to the other groups. The IG presented a reduction in the cross-sectional area and a smaller diameter, an increase in the number of nuclei and a nucleus/fiber ratio, a decrease in the number of capillaries and a capillary/fiber ratio, with an increase in connective tissue. In the IPDG group, there were significant results for increased nucleus/fiber ratio, decreased capillaries and increased connective tissue when compared to the IG group. The IPDG group presented greater muscle tissue degeneration and increased inflammatory cells when compared to the other groups. **Conclusion:** Periodontal disease potentiated the deleterious effects of immobilization of the skeletal striated muscle, through intense destruction of muscle tissue, with significant increase of connective tissue, nucleus/fiber ratio and inflammatory infiltrate, significant reduction of vascularization and reduction of muscle length, with consequent reduction of muscle strength and nociceptive threshold.

Keywords: Periodontitis. Inflammation. Immobilization. Muscle atrophy.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) está intimamente relacionada à higiene bucal. Desse modo, o acúmulo excessivo de bactérias na superfície dentária favorece o desenvolvimento da placa bacteriana e uma reação inflamatória associada a fatores de riscos, como obesidade, tabagismo, diabetes e estresse mental [1]. A prevalência da DP moderada à grave em adultos no Brasil é de 15,3% e ela está intimamente relacionada com o bem-estar e qualidade de vida [2].

A DP é caracterizada por uma inflamação que afeta os tecidos que circundam e suportam os dentes, o periodonto. As duas formas comuns de DP são a gengivite e a periodontite. A gravidade dessa doença depende da interação de espécies bacterianas específicas com a resposta imune do hospedeiro e fatores de risco pré-existentes, provocando uma resposta que pode ser exacerbada ou ineficiente [1].

A resposta inicial do hospedeiro compreende um reconhecimento inato dos componentes microbianos por células hospedeiras da gengiva, recrutando outras células para o local da inflamação [3]. Decorrente disso ocorre produção de mediadores inflamatórios, tais como espécies reativas de oxigênio (EROs), quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias que ajudam a definir a progressão da doença [1, 4-6]. A ativação desses mediadores inflamatórios permite que a DP tenha potencial para contribuir significativamente com a resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro [5]. Um dos efeitos da inflamação sistêmica é a ação das citocinas inflamatórias sobre a perda de massa muscular [7].

A homeostase do músculo esquelético é caracterizada pelo equilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas, e os mediadores pró-inflamatórios parecem ter um papel importante na atrofia muscular [8-12]. As citocinas e radicais livres associados à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) afetam a microcirculação, causando hipóxia neuronal, degeneração axonal e dano muscular [13].

Condições humanas que levam a um repouso prolongado no leito e imobilização causam perda de carga mecânica na musculatura esquelética, diminuição da atividade neuromuscular e redução na produção de energia, levando à atrofia muscular por desuso e consequente fraqueza muscular generalizada [10, 14, 15]. Esse fator, associado à presença de mediadores inflamatórios, caracteriza uma perda potencial de massa muscular, uma vez que a inflamação sistêmica por si só reduz a capacidade de geração de força muscular [16, 17].

A DP é uma doença inflamatória com efeitos sistêmicos e subdiagnosticada em muitos pacientes. Sabendo-se que a inflamação sistêmica promove perda de massa muscular, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a doença periodontal, por meio da inflamação sistêmica, potencializa os efeitos deletérios da imobilização do músculo estriado esquelético, colaborando para o desenvolvimento da atrofia muscular por desuso.

MATERIAIS E MÉTODOS

População do Estudo e Amostra

Foram utilizados 40 Ratos *Wistar* adultos, pesando em média 260 g e idade média de 8 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. O estudo foi conduzido de

acordo com as Normas Internacionais de Ética na Experimentação Animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética de Estudos com Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do LELRF, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e luz (ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro – 7h – 19h) e receberam água e ração comercial à vontade. Os animais foram randomizados em quatro grupos de 10 animais cada: Grupo Controle (GC), Doença Periodontal (GDP), Imobilizado (GI) e Doença Periodontal e Imobilizado (GDPI), com base em estudos preliminares (NASSAR et al., 2009) e em cálculo amostral (Teste Anova com poder de 99% e nível de alfa de 5%).

Indução da Doença Periodontal

Após 7 dias de aclimação, os animais foram pesados, anestesiados (xilazina 0,04 ml/100g e quetamina 0,08 ml/100g) e posicionados em mesa operatória adaptada, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, foi colocado um fio de algodão número 40 ao redor do primeiro molar inferior direito e esquerdo. Essa ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e conseqüente desenvolvimento da DP [18].

Protocolo de Imobilização

Após 15 dias da indução da doença periodontal, os animais foram pesados, anestesiados (xilazina 0,04 ml/100 g e quetamina 0,08 ml/100 g) e imobilizados utilizando um modelo proposto por Carvalho, Shimano e Volpon [23]. Esse modelo foi confeccionado com material próprio para engessar um seguimento corporal, sendo: ligadura de tecido saturada com sulfato de cálcio desidratado (CaSO_4), sob a forma de pó branco, caracterizando uma atadura gessada. Os animais do grupo GI e GDPI tiveram a órtese moldada a partir da região abdominal, logo abaixo das últimas costelas, seguindo para o membro pélvico direito de cada animal, sendo colocada em toda a extensão do membro de forma que este mantivesse a articulação do joelho em extensão, bem como flexão plantar completa de tornozelo, ou seja, em posição de encurtamento do músculo sóleo. Os animais foram mantidos nessa posição por 15 dias consecutivos [24].

A verificação de imobilização foi realizada diariamente pela manhã e foi observada a presença ou não de lesões ou edema de pele. A principal complicação encontrada devido à imobilização foi edema do membro engessado. Nesse caso, o aparato foi retirado e o animal foi mantido livre da imobilização por 24 horas. Após esse período, foi refeita a imobilização. Depois de 30 dias do experimento, o aparato de imobilização foi retirado e os animais foram pesados novamente.

Avaliação da Nocicepção

Foram realizadas três avaliações de nocicepção. A primeira avaliação (AV1) foi antes da indução da doença periodontal para obter valores de base; a segunda avaliação (AV2) foi após 15 dias da indução da doença periodontal e antes da imobilização; por fim, a terceira avaliação (AV3) foi realizada após 30 dias de

doença periodontal e 15 dias de imobilização. Para facilitar a adaptação dos animais ao instrumento, nos três dias anteriores à AV1, foi realizada uma simulação da avaliação [19].

Para avaliar a nocicepção, foi utilizado um analgesímetro digital, tipo filamento de Von Frey da marca *Insight*® (Ribeirão Preto, São Paulo), que consiste em um braço com uma sonda descartável de polipropileno, com a capacidade de avaliar de 0,1-1000 g, ligado a uma caixa de amplificador, o que permite testar a sensibilidade nociceptiva ao estímulo mecânico em animais. O animal foi colocado em caixas de madeira com tampa de acrílico, sendo a base confeccionada em grade metálica vazada, pela qual foi possível inserir o filamento na região plantar da pata do animal. Foi realizada pressão com aumento gradual até o animal retirar o membro e após foi anotado o valor do limiar de retirada. Em cada avaliação, o teste foi repetido três vezes e utilizado o valor médio das repetições, com unidade em gramas-força (gf) [20].

Avaliação da Força Muscular de Preensão

Para a força muscular, foi utilizado o método de avaliação de força de preensão, adaptado do método descrito por Bertelli e Mira [21], em que os animais foram segurados pela cauda permitindo que eles se agarrassem em uma grade ligada a um transdutor de força. Em seguida, os animais foram puxados pela cauda até que eles perdessem a ação de agarrar. Nesse momento, foi avaliada a força máxima do membro pélvico direito, registrada no transdutor. Esse teste foi repetido três vezes e utilizado o valor médio das medidas obtidas. O membro pélvico esquerdo foi contido pelo avaliador impedindo que fosse utilizado no momento em que o animal agarrasse a grade.

A primeira avaliação (AV1) foi realizada antes da indução da doença periodontal para obter valores de base; a segunda avaliação (AV2) foi realizada após 15 dias da indução da doença periodontal e antes da imobilização; por fim, a terceira avaliação (AV3) foi realizada após 30 dias de doença periodontal e após 15 dias de imobilização. Três dias antes da primeira avaliação, os animais foram treinados e adaptados em relação ao equipamento [22].

Análise do Músculo Sóleo

Comprimento e Peso Muscular

Após a coleta, o músculo sóleo direito foi dissecado e limpo, pesado em balança analítica para obtenção da massa muscular (em gramas) e fixado em superfície plana, para a mensuração do comprimento muscular máximo em repouso, por meio de paquímetro digital, fornecido em milímetros. Posteriormente, foi dividido longitudinalmente, em duas partes iguais: a metade lateral foi destinada para a contagem do número de sarcômeros em série e a metade medial para o processamento histológico para a avaliação da morfologia muscular, em corte transversal.

Análise Morfológica e Morfométrica

Para a avaliação morfológica do músculo sóleo, em secção transversa, após a coleta permaneceram em metacarn por 24 horas e foram acondicionados em álcool 70%. Para o processamento histológico, o material foi desidratado em série alcóolica crescente, diafanizado em xilol e incluso em parafina. Foram realizados cortes, com a utilização de um micrótomo rotativo, na espessura de 7 μ m. Após, foram coradas com HE para análise morfológica geral do tecido muscular e em tricrômico de Masson para o tecido conjuntivo [25]. Posteriormente, foi realizada a leitura em microscópio de luz (BX60 *Olympus*®, Tóquio, Japão), na objetiva de 40x para descrição morfológica do tecido.

Na análise morfométrica, foram realizadas as seguintes mensurações: área de secção transversa, menor diâmetro da fibra muscular, contagem do número de fibras, núcleos e capilares sanguíneos. Para essas mensurações, foram obtidas 10 imagens na objetiva de 40X. Em cada imagem, foram mensuradas 10 fibras pelo programa *Image-Pro Plus 6.0*, totalizando 100 mensurações por animal.

Para determinar a densidade do tecido conjuntivo do endomísio e perimísio, foi utilizado o programa *GIMP* (GNU Programa de Manipulação de Imagens) 2.0 (*GNU General Public License*®, Berkeley, Califórnia). A área relativa do tecido conjuntivo (densidade de área) foi calculada dividindo o total de pixels da fotomicrografia pelo total de pixels da marcação do tecido conjuntivo.

As fibras musculares, os núcleos e os capilares sanguíneos presentes na fotomicrografia foram morfológicamente identificados, marcados e contabilizados. Para calcular a razão núcleo por fibra e capilar por fibra, foi realizada a divisão do número total de núcleos e capilares pelo total de fibras musculares presentes no mesmo campo visual. Para evitar erro de amostragem, foram excluídas as fibras, núcleos e capilares sanguíneos projetados sobre as bordas superior e esquerda.

Para a contagem do número de sarcômeros, em análise longitudinal, os músculos sóleos permaneceram em formol 10% por três horas. Após, foram colocados em ácido nítrico 30%. Assim que houve a quebra do tecido conjuntivo, foram armazenados em solução de glicerol 50%. Para a preparação das lâminas, o músculo foi colocado em uma placa de Petri e com auxílio de uma lupa (Micronal) foram isoladas 6 fibras, de tendão a tendão, utilizando uma pinça anatômica fina (12 cm), e montadas em lâminas histológicas contendo esmalte incolor para melhor adesão da fibra. Foram analisadas em microscópio de luz, na objetiva de 40x, fotomicrografadas e digitalizadas para posterior análise no programa *Image-Pro Plus 6.0* (*Media Cybernetics*®, Silver Spring, USA), no qual foi feita a contagem dos sarcômeros ao longo de 50 μ m, em 6 campos não consecutivos, totalizando 300 μ m. O cálculo de regra de 3 simples foi utilizado para estimar o total de sarcômeros em série no comprimento total do músculo [26, 27].

Análise estatística

Para avaliação estatística, foi utilizado o programa BioEstat, por meio dos testes análise de variância ANOVA de uma via seguida do post test Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$, sendo os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

Os resultados quantitativos foram apresentados na forma de tabelas e/ou gráficos, enquanto os resultados sobre a morfologia tecidual foram apresentados em figuras (fotomicrografias) acompanhadas da sua descrição e discussão.

RESULTADOS

Força Muscular de Preensão e Nociceção

Em relação à força muscular de preensão, após 30 dias da indução da DP, na AV3, o GDP apresentou redução significativa da força muscular comparada à AV1. Na AV3, o grupo GI e o grupo GDPI apresentaram força muscular significativamente menor comparada à AV1 e AV2. Quando comparado entre os grupos, na AV3, os grupos GI e GDPI apresentaram força muscular significativamente menor em comparação ao GC e GDP, porém sem diferença estatística entre eles (Tabela 1).

Na avaliação da nociceção, após 15 dias da indução da DP, na AV2, o GDP reduziu significativamente o limiar de retirada ao estímulo nocivo quando comparado à AV1 e também quando comparado ao GC e GDPI; porém, na AV3, esse valor retornou ao basal. O GDPI também apresentou redução significativa desse limiar, porém foi na AV3 em comparação com AV1 e AV2, apresentando também valor significativamente menor em comparação aos demais grupos (Tabela 2).

Peso Corporal, Peso Muscular e Comprimento Muscular

Em relação ao peso inicial dos animais, o GI apresentou-se significativamente menor em relação ao GDPI. Já aos 30 dias de experimento, os grupos que foram imobilizados (GI e GDPI) apresentaram redução significativa dos pesos em relação aos grupos que não foram imobilizados (GC e GDP). Ao avaliar a evolução desses pesos, foi possível observar que apenas o grupo GDPI não teve aumento significativo do início para o final do experimento, como mostrado na Figura 1.

Em relação ao peso muscular, os grupos GI e GDPI apresentaram valor significativamente menor do que os grupos GC e GDP, não havendo diferença estatística entre eles. Quando avaliado o comprimento muscular, o grupo GDPI apresentou comprimento muscular significativamente menor quando comparado ao grupo GC e GDP, porém sem diferença significativa quando comparado ao grupo GI (Tabela 3).

Estimativa do Número de Sarcômeros e Medidas Morfométricas

Os grupos GI e GDPI apresentaram valores significativamente menores na estimativa do número de sarcômeros em série comparado com o grupo GC (Figura 2).

A área de secção transversa reduziu significativamente nos grupos que foram imobilizados, porém, apesar de no grupo GDPI ter diminuído mais, comparado ao grupo GI, não houve diferença significativa; o mesmo ocorreu para análise do menor diâmetro das fibras. Em relação à densidade do tecido conjuntivo, os grupos GDP, GI e GDPI apresentaram aumento significativo do tecido conjuntivo quando comparado ao grupo controle, sendo esse aumento mais expressivo no grupo GDPI, em que a densidade do tecido conjuntivo foi significativamente maior que no grupo GI. Os dados estão representados na Tabela 4.

Nos grupos GI e GDPI, houve aumento significativo na quantidade de núcleos e também na razão núcleo/fibra, comparado ao GC e GDP. Ainda, o GDPI apresentou razão núcleo/fibra significativamente maior quando comparado ao GI, porém sem diferença significativa no número de núcleos (Tabela 5).

Em relação aos capilares sanguíneos, os grupos GI e GDPI apresentaram redução significativa no número de capilares quando comparados ao GC, sendo essa redução mais expressiva no GDPI, que apresentou valores significativamente menores em comparação ao GI. A razão capilar/fibra diminuiu significativamente nos grupos DI e GDPI, porém sem diferença significativa entre eles (Tabela 6).

Descrição Morfológica do Músculo Sóleo

O músculo sóleo do grupo controle (GC) apresentou fibras com morfologia normal, de formato poligonal, multinucleadas com núcleos em posição periférica, fascículos bem definidos com organização e estrutura preservada (Figura 3a). No grupo Doença Periodontal (GDP), as fibras também apresentaram, na sua maioria, aspecto normal semelhante ao grupo GC. No entanto, houve aumento no número de núcleos, muitos apresentaram halo basofílico e alguns núcleos com posição central. Também apresentou algumas fibras com formato irregular (Figura 3b). No grupo imobilizado (GI), a morfologia das fibras mostrou-se semelhante ao GDP, com fibras de formato irregular e núcleo de posição central, entretanto com diâmetro aparentemente menor que o GC e GDP. Ainda, apresentou discreto infiltrado de células inflamatórias no espaço intersticial (Figura 3c). No grupo Doença Periodontal e Imobilizado (GDPI), a associação das duas condições potencializou a degeneração muscular, com a presença de maior número de fibras com formato irregular, núcleos aumentados e alguns com posição central e halo basofílico. Também um grande número de células inflamatórias foi observado no interstício (Figura 3d).

Na análise do tecido conjuntivo, os grupos GC e GDP apresentaram-se com características e arranjo normal no epimísio, perimísio e endomísio (Figura 4a e b). Nos grupos GI e GDPI, o tecido apresentou arranjo característico, porém houve aumento no perimísio e endomísio, com presença de fibroblastos e células inflamatórias. Ainda, essas alterações se mostram mais pronunciadas no GDPI (Figura 4c e d).

DISCUSSÃO

No presente estudo, encontrou-se que a imobilização reduziu o peso e comprimento muscular, a estimativa do número de sarcômeros em série, força muscular e limiar nociceptivo em comparação aos grupos não imobilizados. Esses achados corroboram com a análise morfológica e morfométrica, em que a imobilização promoveu perda de massa muscular, caracterizada pela redução significativa da área de secção transversa das fibras musculares, redução do menor diâmetro, aumento no número de núcleos e diminuição dos capilares sanguíneos, com aumento significativo de tecido conjuntivo e visível degeneração da fibra muscular.

Os achados do presente estudo estão de acordo com Carvalho et al. [28], que, após imobilizar animais por 21 dias, encontraram em análise histológica aumento do tecido conjuntivo, variação do tamanho da fibra e presença de processos degenerativos, bem como diminuição do peso muscular no grupo imobilizado. Em 2008, Konnovet et al. [29] imobilizaram animais por 15 dias e também encontraram redução do peso e comprimento muscular e redução do número de sarcômeros em série. Resultados semelhantes foram encontrados recentemente [20, 30].

Miyachi e Yamazaki [31] usaram a suspensão do membro posterior como modelo de atrofia muscular por desuso e os resultados foram semelhantes ao do presente estudo, com diminuição do peso

muscular, redução da área de secção transversa e redução da razão capilar/fibra. Dessa forma, as alterações encontradas no presente estudo estão de acordo com a literatura e mostram a eficácia do modelo escolhido para atrofia muscular por desuso, havendo desestruturação das fibras e tecidos adjacentes, decorrente da ativação dos sistemas proteolíticos, promovendo diminuição de síntese e aumento de degradação de proteínas, que provoca uma adaptação muscular em relação ao seu comprimento, peso, número de unidades contráteis, diminuição do diâmetro das fibras, diminuição no número de capilares e número de núcleos [28, 29, 31, 32].

Essas alterações nos grupos imobilizados estão ligadas ao fato de que, na atrofia muscular, ocorre um aumento na produção de EROS em relação ao estresse oxidativo [33, 34] que atua na ativação dos sistemas calpaína e caspase-3, que promovem a degradação dos sarcômeros, levando à diminuição das unidades contráteis, com consequente redução do comprimento muscular e, também, com a ativação do sistema ubiquitina-proteossoma, que, associado ao sistema de autofagia, promove disfunção celular e degradação das miofibrilas [35-37].

Outro resultado importante do presente estudo foi que a doença periodontal associada à imobilização promoveu potencialização dos efeitos deletérios, promovendo, inclusive, a diminuição da força muscular de forma independente, após 15 dias do início do processo inflamatório, bem como quando associada à imobilização. O mesmo resultado foi encontrado para o comprimento muscular e limiar nociceptivo. Esses resultados também são confirmados pela análise morfológica e morfométrica, em que a doença periodontal por si só promoveu aumento significativo da densidade do tecido conjuntivo e, quando associada à imobilização, houve intensificação desse efeito, bem como potencializou a redução de capilares sanguíneos e aumento na razão núcleo/fibra, evidenciados na morfologia pela destruição mais expressiva do tecido muscular.

Até o momento, não foram encontrados estudos que relacionem a doença periodontal com a atrofia muscular por desuso, porém alguns estudos mostram que essa doença tem grande impacto na saúde sistêmica dos indivíduos [38-41]. Oliveira et al. [42] encontraram que a doença periodontal pode ser considerada um fator de risco para diminuição do desempenho físico em indivíduos adultos, o que pode ser explicado pela elevação das citocinas pró-inflamatórias sistêmicas, que podem agir modificando o metabolismo muscular e levar a perda de massa e diminuição da força. Recentemente, Eremenko et al. [43] encontram que a doença periodontal está relacionada com a perda de força muscular em indivíduos adultos e que essa associação também está relacionada à presença de marcadores inflamatórios. Esses achados estão de acordo com resultados encontrados no presente estudo e mostram que a doença periodontal tem potencial inflamatório para atingir o sistema muscular esquelético, porém pouco se sabe como ocorrem esses efeitos em indivíduos que necessitam de repouso prolongado, em estados semivegetativos e vegetativos e também os efeitos no condicionamento físico e sistema osteomioarticular.

Caron et al. [44] mostraram que, durante o processo de atrofia muscular, ocorre aumento nas concentrações de TNF- α e interleucinas; o mesmo ocorre durante o curso da doença periodontal [45, 46]. Dessa forma, a elevação da concentração de citocinas inflamatórias sistêmicas pela DP parece ser um caminho plausível para justificar a potencialização dos efeitos deletérios da imobilização encontrados no presente estudo [42]. No entanto, os possíveis mecanismos envolvidos e qual via é ativada para promover atrofia muscular associada à inflamação pela doença periodontal devem ainda ser elucidados.

O músculo esquelético expressa receptores para o TNF- α [7] e, durante o processo inflamatório, por essa citocina estar aumentada sistemicamente, ocorre maior ligação aos seus receptores no sarcolema, estimulando a produção de EROS pela mitocôndria, que promove a perda de força muscular por alteração na função dos miofilamentos e aumenta a expressão de proteínas na via ubiquitina-proteossoma, gerando maior degradação e destruição de proteínas contráteis [47]. Li et al. [48] mostram que, além de o TNF- α estimular a produção de EROS, essa citocina é capaz de atuar diretamente no aumento da expressão de genes do sistema ubiquitina-proteossoma, promovendo a perda de massa muscular. Resultados semelhantes foram encontrados recentemente por Lin et al. [49]. Dessa forma, a ativação da proteólise muscular está associada às citocinas inflamatórias e estresse oxidativo [50].

A ativação dos sistemas proteolíticos, durante a atrofia pelo estresse oxidativo e também pelo processo inflamatório, ocorre nos primeiros dias de imobilização. No processo de atrofia muscular, estudos mostram que há diminuição do número de núcleos que leva à diminuição do tamanho da fibra [32, 51]. Porém, no presente estudo, houve aumento do número de núcleos e razão núcleo/fibra observado no grupo imobilizado, que pode ser justificado pela presença de infiltrado inflamatório e também pela proliferação de células satélites [44, 52]. É evidente que o processo inflamatório local desencadeado pela imobilização gera efeitos deletérios e esses efeitos se mostram ainda mais intensos na presença de uma inflamação sistêmica, uma vez que, no grupo imobilizado associado com doença periodontal, a razão núcleo/fibra foi significativamente maior.

O aumento do estresse oxidativo, no processo de atrofia muscular, também está relacionado à redução dos capilares sanguíneos, promovendo diminuição do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que é responsável pela proliferação das células endocapilares [33, 34]. No presente estudo, a quantidade de capilares sanguíneos foi significativamente menor no grupo GDPI em comparação ao GI, indicando que, devido ao processo inflamatório ser mais intenso, ocorreu um aumento mais expressivo do estresse oxidativo com conseqüente potencialização na redução da vascularização.

Na atrofia do músculo esquelético, ocorre aumento do tecido conjuntivo, com conseqüente aumento na síntese de colágeno tipo I e diminuição da sua degradação, o que promove maior rigidez ao tecido levando a perda da elasticidade com conseqüentes alterações funcionais [52, 53]. Foi possível observar, no presente estudo, que nos grupos GDP, GI e GDPI houve aumento significativo do tecido conjuntivo em comparação ao grupo controle. No grupo GDPI, observou-se que a densidade do tecido conjuntivo foi significativamente maior em comparação ao grupo GI; no grupo GDP, houve aumento do tecido conjuntivo comparado com o grupo controle. Quintana et al. [50] encontraram que elevadas concentrações de TNF- α e EROS promoveram atrofia muscular com aumento do tecido conjuntivo. Dessa forma, o aumento do tecido conjuntivo no grupo GDP e sua potencialização no grupo GDPI podem estar relacionados ao aumento de mediadores inflamatórios pela doença periodontal. Esses achados indicam a presença de fibrose muscular, o que promove alteração na funcionalidade [28], que pôde ser demonstrada pela redução da força muscular de preensão nos respectivos grupos.

Em relação ao limiar nociceptivo, o grupo GI não apresentou redução após o período de imobilização, o que vai contra os resultados encontrados por Chuganjiet et al. [54], em que houve redução desse limiar, caracterizado por hiperalgisia induzida pela imobilização. Contudo, esses animais foram imobilizados por 8 semanas. A imobilização causa alterações no limiar nociceptivo e aumento nas

concentrações de TNF- α em animais que ficaram 4 semanas imobilizados e tinham associado fratura de tíbia [55]. No presente estudo, os animais ficaram 15 dias imobilizados. No grupo GDPI, houve redução significativa do limiar nociceptivo; entretanto, no grupo GI, isso não ocorreu, mostrando que 15 dias de imobilização podem não ter sido suficientes para induzir alterações no limiar nociceptivo. Porém, esse fator associado a uma condição de inflamação (GDPI) conseguiu promover alterações significativas, que pode ser justificado pela diminuição do limiar nociceptivo em resposta à presença de citocinas [56, 57].

No presente estudo, não foi possível realizar a dosagem das concentrações dos marcadores inflamatórios, porém é conhecido que a inflamação sistêmica promove perda de massa muscular [14, 58-62]. Dessa forma, as características descritas pelos estudos supracitados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, estando mais evidentes na associação da DP com a imobilização.

Inúmeros mecanismos podem estar envolvidos na potencialização da atrofia muscular, decorrente da inflamação sistêmica causada pela doença periodontal. O que nossos resultados mostram é que existe potencialização desses efeitos deletérios da imobilização do músculo esquelético, porém, em nosso conhecimento, é o primeiro estudo que evidencia a associação desses dois fatores. Ainda, este estudo é pioneiro em demonstrar os efeitos morfológicos e funcionais da DP associada à imobilização no músculo esquelético. Dessa forma, mais pesquisas devem ser realizadas para dar continuidade à elucidação dos mecanismos envolvidos com essas alterações, bem como buscar outras alterações funcionais e morfológicas relacionadas à doença periodontal e ao tecido muscular esquelético, com objetivo de entender essas interações e elaborar medidas preventivas que atendam os indivíduos que necessitem de imobilização ou repouso prolongado e são portadores da doença periodontal, a fim de minimizar esses efeitos deletérios.

CONCLUSÃO

A doença periodontal potencializou os efeitos deletérios da imobilização do músculo estriado esquelético, por meio da intensa degeneração do tecido muscular, com significativo aumento do tecido conjuntivo, da razão núcleo/fibra e presença infiltrado inflamatório, significativa diminuição da vascularização e redução do comprimento muscular, com conseqüente redução da força muscular e limiar nociceptivo.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERÊNCIAS

1. Garlet, G. P., A. M. F. Aranha, E. M. Silveira, A. E. Vieira, C. M. Queiroz-Junior, M. F. M. Madeira, S. Y. Fukada, and T. A. Silva. 2012. The Role of Chemokines and Cytokines in the Pathogenesis of Periodontal and Periapical Lesions: Current Concepts. In *Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Basis*, ed. Rijeka: InTech 219-264.
2. Vettore, M. V., R. A. A. Marques, and M. A. Peres. 2010. Desigualdades sociais e doença periodontal no estudo SBBrazil 2010: abordagem multinível. *Revista Saúde Pública* 47(Supl3): 29-39.
3. Craig, R. G., A. M. Pernat, R. Pecoits-Filho, N. W. Levin, and P. Kotanko, 2013. Periodontal diseases and systemic inflammation. *Seminars in Dialysis* 26(1): 16–39.
4. Khalaf, H., J. Lönn, and T. Bengtsson. 2014. Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: possible role for TGF- β 1 as a marker for disease progression. *Cytokine* 67(1): 29-35.
5. Leishman, S. J., G. J. Seymour, and P. J. Ford. 2013. Local and systemic inflammatory responses to experimentally induced gingivitis. *Disease Markers* 35(5): 543-549.
6. Ramseier, C. A., J. S. Kinney, A. E. Herr, T. Braun, J. V. Sugai, C. A. Shelburne, L. A. Rayburn, H. M. Tran, A. K. Singh, and W. V. Giannobile. 2009. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *Journal of Periodontology* 80(3): 436-446.
7. Winkelman, C. Inactivity and inflammation: selected cytokines as biologic mediators in muscle dysfunction during critical illness. *AACN Clinical Issues* 15(1): 74-82.
8. Haddad, F., F. Zaldivar, D. M. Cooper, and G. R. Adams. 2005. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology (1985)* 98(3): 911–917.
9. Lang, C. H., R. A. Frost, and T. C. Vary. 2007. Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. *American Journal of Physiology* 293(2): E453-E459.
10. Poulsen, J. B. Impaired physical function, loss of muscle mass and assessment of biomechanical properties in critical ill patients. *Danish Medical Journal* 59(11): B4544.
11. Tsujinaka, T., J. Fujita, C. Ebisui, M. Yano, E. Kominami, K. Suzuki, K. Tanaka, A. Katsume, Y. Ohsugi, H. Shiozaki, and M. Monden. 1996. Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation* 97(1): 244–249.
12. Zamir, O., P. O. Hasselgren, S. L. Kunkel, J. Frederick, T. Higashiguchi, and J. E. Fischer. 1992. Evidence that tumor necrosis factor participates in the regulation of muscle proteolysis during sepsis. *Archives of Surgery* 127(2): 170–174.
13. De Letter, M. A., P. I. Schmitz, L. H. Visser, F. M. Verheul, R. L. L. A. Schellens, D. A. W. Op De Coul, and F. G. M. Van Der Meché. 2001. Risk factors for the development of polyneuropathy and myopathy in critically ill patients. *Critical Care Medicine* 29(12): 2281-2286.
14. Langhans, C., S. Weber-Carstens, F. Schmidt, J. Hamati, M. Kny, X. Zhu, T. Wollersheim, S. Koch, M. Krebs, H. Schulz, D. Lodka, K. Saar, S. Labeit, C. Spies, N. Hubner, J. Spranger, S. Spuler, M. Boschmann, G. Dittmar, G. Butler-Browne, V. Mouly, and J. Fielitz. 2014. Inflammation-induced acute phase response in skeletal muscle and critical illness myopathy. *Plos One* 9(3): e92048.

15. Ochala, J., A. Gustafson, M. L. Diez, G. Renaud, M. Li, S. Aare, R. Qaisar, V. C. Banduseela, Y. Hedstrom, X. Tang, B. Dworkin, G. C. Ford, K. S. Nair, S. Perera, M. Gautel, and L. Larsson. 2011. Preferential skeletal muscle myosin loss in response to mechanical silencing in a novel rat intensive care unit model: underlying mechanisms. *The Journal of Physiology* 15(589): 2007-2026.
16. Fink, H., M. Helming, C. Unterbuchner, A. Lenz, F. Neff, J. A. J. Martyn, and M. Blobner. 2008. Systemic inflammatory response syndrome increases immobility-induced neuromuscular weakness. *Critical Care Medicine* 36(3): 910-916.
17. Poulsen, J. B., K. Moller, C. V. Jensen, S. Weisdorf, H. Kehlet, and A. Perner. 2011. Effect of transcutaneous electrical muscle stimulation on muscle volume in patients with septic shock. *Critical Care Medicine* 39(3): 456-461.
18. Nassar, P. O, C. A. Nassar, M. R. Guimarães, S. G. Aquino, D. C. Andia, M. N. Muscara, D. M. P. Spolidorio, C. Rossa Jr., and L. C. Spolidorio. 2009. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *Journal of Periodontal Research* 44(4): 479-488.
19. Carvalho, C. M. M., A. C. Shimano, and J. B. Volpon. 2002. Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica* 18(2): 65-73.
20. Kunz, R. I., J. G. Coradini, L. I. Silva, G. R. F. Bertolini, R. M. C. Brancalhão, and L. F. C. Ribeiro. 2014. Effects of immobilization and remobilization on the ankle joint in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 47(10): 842-849.
21. Marcioli, M. A. R., J. G. Coradini, R. I. Kunz, L. F. C. Ribeiro, R. M. C. Brancalhão, and G. R. F. Bertolini. 2013. Nociceptive and histomorphometric evaluation of neural mobilization in experimental injury of the median nerve. *The Scientific World Journal* 2013: 1-6.
22. Vivancos, G. G., W. A. Verri Jr., T. M. Cunha, I. R. S. Schivo, C. A. Parada, F. Q. Cunha, and S. H. Ferreira. 2004. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37(3): 391-399.
23. Bertelli, J. A., and J. C. Mira. 1995. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 58(1-2): 151-155.
24. Coradini, J. G., C. M. M. Kakihata, R. I. Kunz, T. K. Errero, M. L. Bonfleur, and G. R. F. Bertolini. 2015. Evaluation of grip strength in normal and obese Wistar rats submitted to swimming with overload after median nerve compression. *Revista Brasileira de Reumatologia* 55(1): 43-47.
25. Junqueira, L. C., and L. M. M. Junqueira. 1983. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Santos.
26. Coutinho, E. L., A.R. S. Gomes, C. N. França, J. Oishi, and T. F. Salvini. 2004. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37(12): 1853-1861.
27. Williams, P. E., T. Catanese, E. G. Lucey, and G. Goldspink. 1988. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *Journal of Anatomy* 158: 109-114.

28. Carvalho, M. M., W. R. Martins, J. C. Blackzick, C. A. C. Júnior, H. A. De Souza, S. A. S. Kückelhaus, and M. R. Mota. 2013. Análise morfométrica dos efeitos da imobilização sobre o músculo gastrocnêmio de ratos. *Universitas: Ciências da Saúde* 11(2): 99-106.
29. Konno, E. A. B., E. P. B. Alves, G. R. F. Bertolini, C. H. Barbieri, and N. Mazzer. 2008. Remobilização por alongamento estático cíclico em músculo sóleo de ratos imobilizados em encurtamento. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 14(2): 122-125.
30. Silva, L. I., A. Meireles, C. M. Nascimento, B. P. Rocha, C. T. Rosa, L. F. C. Ribeiro, R. M. C. Brancalhão, and G. R. F. Bertolini. 2013. Avaliação de parâmetros histomorfométricos em sóleos de ratos submetidos à remobilização por salto em meio aquático. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 19(3): 219-222.
31. Miyachi, R., and T. Yamazaki. 2015. Effects of static interventions on disuse atrophy of the rat soleus muscle at different sites along its longitudinal axis. *Journal of Physical Therapy Science* 27(7): 2317–2321.
32. Zhong, H., R. R. Roy, B. Siengthai, and V. R. Edgerton. 2005. Effects of inactivity on fiber size and myonuclear number in rat soleus muscle. *Journal of Applied Physiology (1985)* 99(4): 1494–1499.
33. Kanazashi, M., Y. Okumura, S. Al-Nassan, S. Murakami, H. Kondo, F. Nagatomo, N. Fujita, A. Ishihara, R. R. Roy, and H. Fujino. 2013. Protective effects of astaxanthin on capillary regression in atrophied soleus muscle of rats. *Acta Physiologica* 207(2): 405–415.
34. Kanazashi, M., M. Tanaka, S. Murakami, H. Kondo, F. Nagatomo, A. Ishihara, R. R. Roy, and H. Fujino, 2014. Amelioration of capillary regression and atrophy of the soleus muscle in hindlimb-unloaded rats by astaxanthin supplementation and intermittent loading. *Experimental Physiology* 99(8): 1065–1077.
35. Pierre, N., Z. Appriou, A. Gratas-Delamarche, and F. Derbré. 2016. From physical inactivity to immobilization: dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin resistance and atrophy. *Free Radical Biology & Medicine* 98: 197-207.
36. Talbert, E. E., A. J. Smuder, K. Min, O. S. Kwon, and S. K. Powers. Calpain and caspase-3 play required roles in immobilization-induced limb muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology (1985)* 114(10): 1482–1489.
37. Huang, J., and N. E. Forsberg. 1998. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(21): 12100–12105.
38. Nassar, C. A., R. C. De Moraes, M. B. Secundes, P. Bernardon, P. O. Nassar, and V. Camilotti. 2014. The effect of resin composites and polishing procedure on periodontal tissue parameters in patients with Diabetes Mellitus. *The European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry* 22(4): 146-151.
39. Brandelero Jr, S., M. L. Bonfleur, R. A. Ribeiro, E. C. Vanzela, C. A. Nassar, P. O. Nassar, and S. L. Balbo. 2012. Decreased TNF- α gene expression in periodontal ligature in MSG-obese rats: a possible protective effect of hypothalamic obesity against periodontal disease? *Archives of Oral Biology* 57(3): 300-306.
40. Do Nascimento, C. M., T. Cassol, F. S. Da Silva, M. L. Bonfleur, C. A. Nassar, and P. O. Nassar. 2013. Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal disease. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: Targets and Therapy. [electronic resource]* 7(6): 365-370.

41. Toregeani, J. F., C. A. Nassar, P. O. Nassar, K. M. Toregeani, G. K. Gonzatto, R. Vendrame, J. S. Castilhos, L. S. Rotta, A. C. Reinheimer, A. Longoni, and M. W. Barcella. 2016. Evaluation of periodontitis treatment effects on carotid intima-media thickness and expression of laboratory markers related to atherosclerosis. *General Dentistry* 64(1): 55-62.
42. Oliveira, J. A. P., C. B. Hoppe, M. S. Gomes, F. S. Grecca, and A. N. Haas. 2015. Periodontal disease as a risk indicator for poor physical fitness: a cross-sectional observational study. *Journal of Periodontology* 86(1): 44-52.
43. Eremenko, M., C. Pink, R. Biffar, C. O. Schmidt, T. Ittermann, T. Kocher, and P. Meisel. 2016. Cross-sectional association between physical strength, obesity, periodontitis and number of teeth in a general population. *Journal of Clinical Periodontology* 43(5): 401-407.
44. Caron, A. Z., G. Drouin, J. Desrosiers, F. Trens, and G. Grenier. 2009. A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *Journal of applied physiology (1985)* 106(6): 2049-2059.
45. Liao, C. H., W. Fei, S. H. Shen, M. P. Yin, and C. Lu. 2014. Expression and distribution of TNF- α and PGE2 of periodontal tissues in rat periodontitis model. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7(5): 412-416.
46. Da Costa, T. A., M. J. B. Silva, P. M. Alves, J. E. L. Chica, E. Z. Barcelos, M. A. A. Giani, G. P. Garlet, J. S. Silva, V. R. Júnior, D. B. R. Rodrigues, and C. R. B. Cardoso. 2015. Inflammation biomarkers of advanced disease in nongingival tissues of chronic periodontitis patients. *Mediators of Inflammation* 2015.
47. Reid, M. B., and Y. P. Li. 2001. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 171(3): 225-232.
48. Li, Y. P., Y. Chen, J. John, J. Moylan, B. Jin, D. L. Mann, and M. B. Reid. 2015. TNF- α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 19(3): 362-370.
49. Lin, S. Y., Y. Y. Wang, Y. H. Chuang, and C. J. Chen. 2016. Skeletal muscle proteolysis is associated with sympathetic activation and TNF- α -ubiquitin-proteasome pathway in liver cirrhotic rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 31(4): 890-896.
50. Quintana, H. T., J. A. Bortolin, N. T. Da Silva, F. A. P. Ribeiro, E. A. Liberti, D. A. Ribeiro, and F. De Oliveira. 2015. Temporal study following burn injury in young rats is associated with skeletal muscle atrophy, inflammation and altered myogenic regulatory factors. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society* 64(1): 53-62.
51. Ferreira, R., M. J. Neuparth, A. Ascensão, J. Magalhães, J. Duarte, and F. Amado. 2004. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto* 4(3): 94-111.
52. Slimani, L., D. Micol, J. Amat, G. Delcros, B. Meunier, D. Taillandier, C. Polge, D. Béchet, D. Dardevet, B. Picard, D. Attaix, A. Listrat, and L. Combare. 2012. The worsening of tibialis anterior muscle atrophy during recovery post-immobilization correlates with enhanced connective tissue area, proteolysis, and apoptosis. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 303(11): E1335-E1347.

53. Fernandes, K. C. B. G., M. L. O. Polacow, R. R. Guirro, G. E. R. Campos, M. C. Somazz, V. F. Pinto, C. B. Fuentes, and R. M. Teodori. 2005. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Revista Brasileira de Fisioterapia* 9(2): 235-241.
54. Chuganji, S., J. Nakano, Y. Sekino, Y. Hamaue, J. Sakamoto, and M. Okita. 2015. Hyperalgesia in an immobilized rat hindlimb: effect of treadmill exercise using non-immobilized limbs. *Neuroscience Letters* 584: 66–70.
55. Guo, T. Z., T. Weia, W. W. Lia, X. Q. Li, J. D. Clarkc, and W. S. Kingerya. 2014. Immobilization contributes to exaggerated neuropeptide signaling, inflammatory changes, and nociceptive sensitization after fracture in rats. *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society* 15(10): 1033–1045.
56. Abramova, A. Y., A. Y. Kozlov, and S. S. Pertsov. Dynamics of changes in nociceptive reactions of rats after peripheral administration of lipopolysaccharide. 2014. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 157(4): 413–415.
57. Teixeira, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. *Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM e Dor Orofacial* 1(4): 329-334.
58. Voisin, L., D. Breuillé, L. Combaret, C. Pouyet, D. Taillandier, E. Aurousseau, C. Obled, and D. Attaix. 1996. Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *The Journal of Clinical Investigation* 97(7): 1610–1617.
59. Breuille, D., M. Arnal, F. Rambourdin, G. Bayle, D. Leveux, and C. Obled. 1998. Sustained modifications of protein metabolism in various tissues in a rat model of long-lasting sepsis. *Clinical Science* 94(4): 413-423.
60. Rossignol, B., G. Gueret, J. Pennec, J. Morel, F. Rannou, M. Giroux-Metges, H. Talarmin, M. Gioux, and C. C. Arvieux. 2008. Effects of chronic sepsis on contractile properties of fast twitch muscle in an experimental model of critical illness neuromyopathy in the rat. *Critical Care Medicine* 36(6): 1855–1863.
61. Ahlbeck, K., K. Fredriksson, O. Rooyackers, G. Maback, S. Remahl, T. Ansved, L. Eriksson, and P. Radell. 2009. Signs of critical illness polyneuropathy and myopathy can be seen early in the ICU course. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 53(6): 717–723.
62. Z'graggen, W. J., L. Brander, D. Tuchscherer, O. Scheidegger, J. Takala, and H. Bostock. 2011. Muscle membrane dysfunction in critical illness myopathy assessed by velocity recovery cycles. *Clinical Neurophysiology* 122(4): 834–841.

Tabela 1 – Valores de Força Muscular de Preensão (gf) de todos os grupos estabelecidos.

Grupos	GC	GDP	GI	GDPI
AV1	31,06 ± 9,8	36,63 ± 11,3*	29,81 ± 10,1*	40,88 ± 7,7*
AV2	30,22 ± 8,5	30,13 ± 4,6* [#]	41,54 ± 13,4*	43,67 ± 13,2*
AV3	27,33 ± 11,9 ^B	24,81 ± 5,9^{#B}	10,50 ± 4,1^{#A}	10,33 ± 5,9^{#A}

GC: Grupo Controle; GDP: Grupo Doença Periodontal; GI: Grupo Imobilizado; GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado. Unidade de medida: grama força (gf). Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos. Símbolos diferentes: Dados estatisticamente diferentes dentro do mesmo grupo ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Valores das avaliações da Nocicepção (gf) do músculo de todos os grupos estabelecidos

GRUPOS	GC	GDP	GI	GDPI
AV1	92,26 ± 11,8	94,37 ± 19,4 [#]	88,07 ± 24,1	94,19 ± 17,1*
AV2	96,67 ± 9,9 ^{AC}	76,87 ± 9,5*^B	88,08 ± 14,7 ^{AB}	95,29 ± 10,3* ^A
AV3	92,76 ± 14,4 ^A	98,17 ± 16,5 ^{#A}	83,73 ± 21,2 ^A	47,37 ± 9,0^{#B}

GC: Grupo Controle; GDP: Grupo Doença Periodontal; GI: Grupo Imobilizado; GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado. Unidade de medida: grama força (gf). Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos. Símbolos diferentes: Dados estatisticamente diferentes dentro do mesmo grupo ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Valores do peso e comprimento muscular de todos os grupos analisados

Grupos	Peso (g)	Comprimento muscular (mm)
GC	0,24 ± 0,02 ^A	22,31 ± 2,0 ^A
GDP	0,22 ± 0,03 ^A	21,52 ± 2,5 ^A
GI	0,12 ± 0,02 ^B	19,68 ± 1,9 ^{AB}
GDPI	0,10 ± 0,01 ^B	18,24 ± 2,3^B

GC: Grupo Controle; GDP: Grupo Doença Periodontal; GI: Grupo Imobilizado; GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado. Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Área de secção transversa, menor diâmetro e tecido conjuntivo

GRUPOS	Área de Secção Transversal (μm^2)	Menor diâmetro (μm)	Tecido Conjuntivo (%)
GC	3438,42 \pm 267,5 ^A	45,09 \pm 2,7 ^A	1,77 \pm 0,39 ^A
GDP	3251,68 \pm 326,0 ^A	45,90 \pm 1,8 ^A	2,67 \pm 0,23^B
GI	2428,94 \pm 373,9^B	39,16 \pm 3,4^B	4,44 \pm 1,0^C
GDPI	2084,05 \pm 148,3^B	35,81 \pm 1,7^B	6,44 \pm 0,89^D

GC: Grupo Controle; GDP: Grupo Doença Periodontal; GI: Grupo Imobilizado; GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado. Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Total de núcleos e razão núcleo por fibra

Grupos	Nº de núcleos	Razão núcleo/fibra
GC	135,74 \pm 20,5 ^A	3,90 \pm 0,4 ^A
GDP	152,59 \pm 14,0 ^A	4,37 \pm 0,2 ^{AB}
GI	199,82 \pm 11,7^B	5,29 \pm 0,7^B
GDPI	218,61 \pm 12,2^B	6,47 \pm 0,8^C

GC: Grupo Controle; GDP: Grupo Doença Periodontal; GI: Grupo Imobilizado; GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado. Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Número de capilares e razão capilar por fibra

Grupos	Nº de Capilares	Razão capilar/fibra
GC	17,63 \pm 2,5 ^A	0,53 \pm 0,09 ^A
GDP	15,79 \pm 1,9 ^{AB}	0,49 \pm 0,06 ^A
GI	14,37 \pm 1,0^B	0,36 \pm 0,05^B
GDPI	12,06 \pm 1,3^C	0,34 \pm 0,05^B

GC: Grupo Controle; GDP: Grupo Doença Periodontal; GI: Grupo Imobilizado; GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado. Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$).

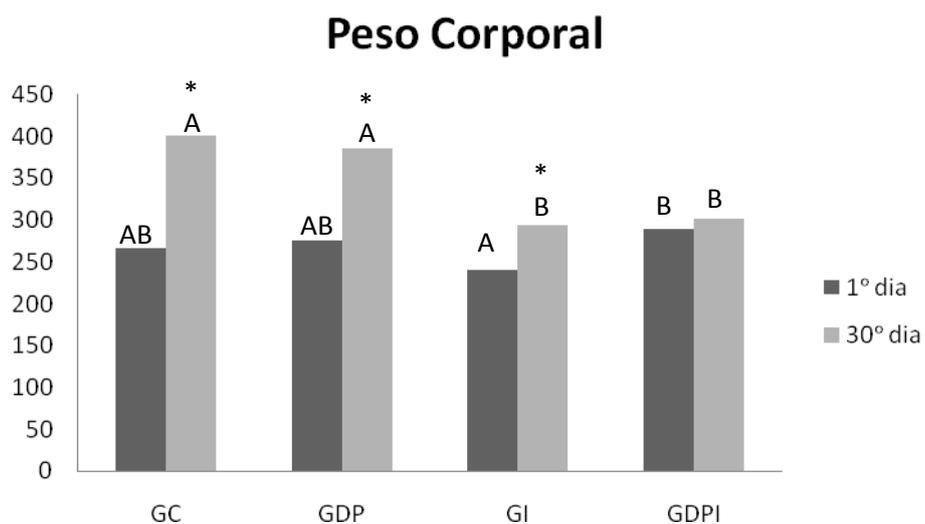
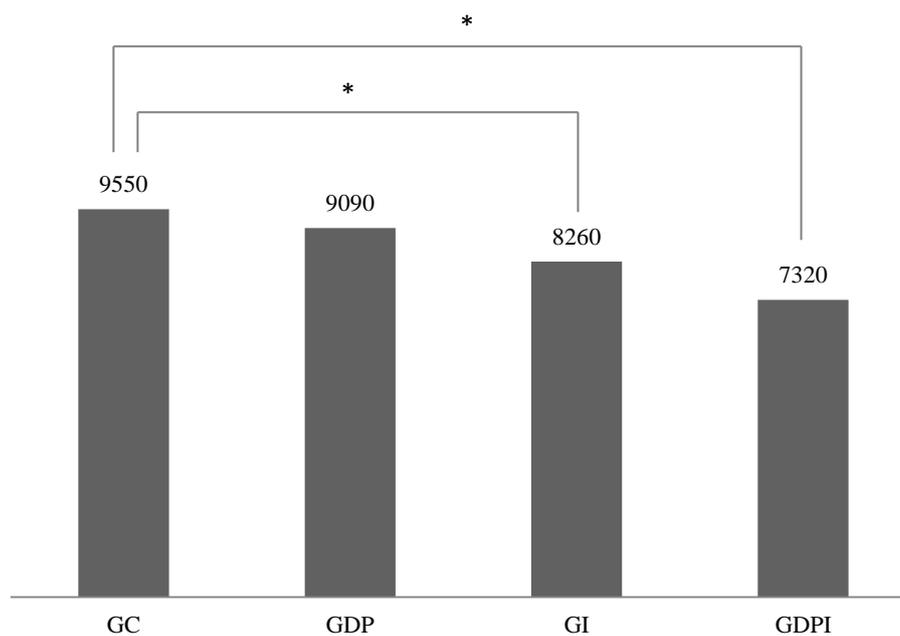


Figura 1 – Evolução do peso corporal dos animais no decorrer dos 30 dias de experimento. GC: Grupo Controle. GDP: Grupo Doença Periodontal, GI: Grupo Imobilizado, GDPI: Grupo Doença Periodontal Imobilizado (letras diferentes: Dados estatisticamente diferentes entre os grupos - 1º dia e 30º dia ($p < 0,05$)).

* Dados estatisticamente diferentes dentro do mesmo grupo - Teste T-Student ($p < 0,05$).



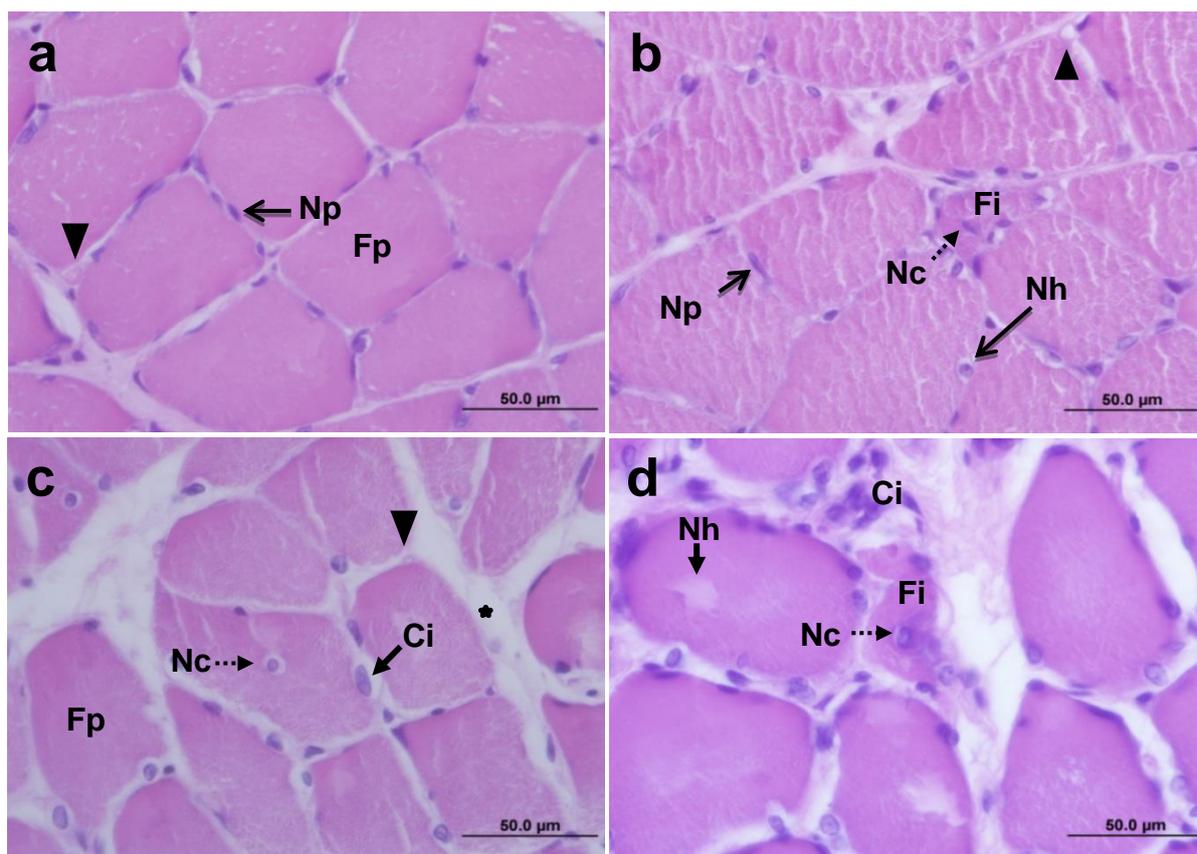


Figura 2 – Fotomicrografias do músculo sóleo de ratos Wistar em secção transversal, coloração HE. **A:** Grupo Controle, evidenciando fibras de aspecto normal com formato poligonal (Fp), núcleo periférico (Np), presença de capilares sanguíneos (cabeça de seta) e tecido conjuntivo com arranjo característico, perímio (estrela). **B:** Grupo Doença Periodontal com algumas fibras de formato irregular (Fi), aumento do número de núcleos, com alguns de posição central (Nc) e halo basofílico (Nh). **C:** Grupo Imobilizado apresentando células inflamatórias (Ci) **D:** Grupo Doença Periodontal e Imobilizado, com aumento de células inflamatórias (Ci) e fibra com formato irregular (Fi).

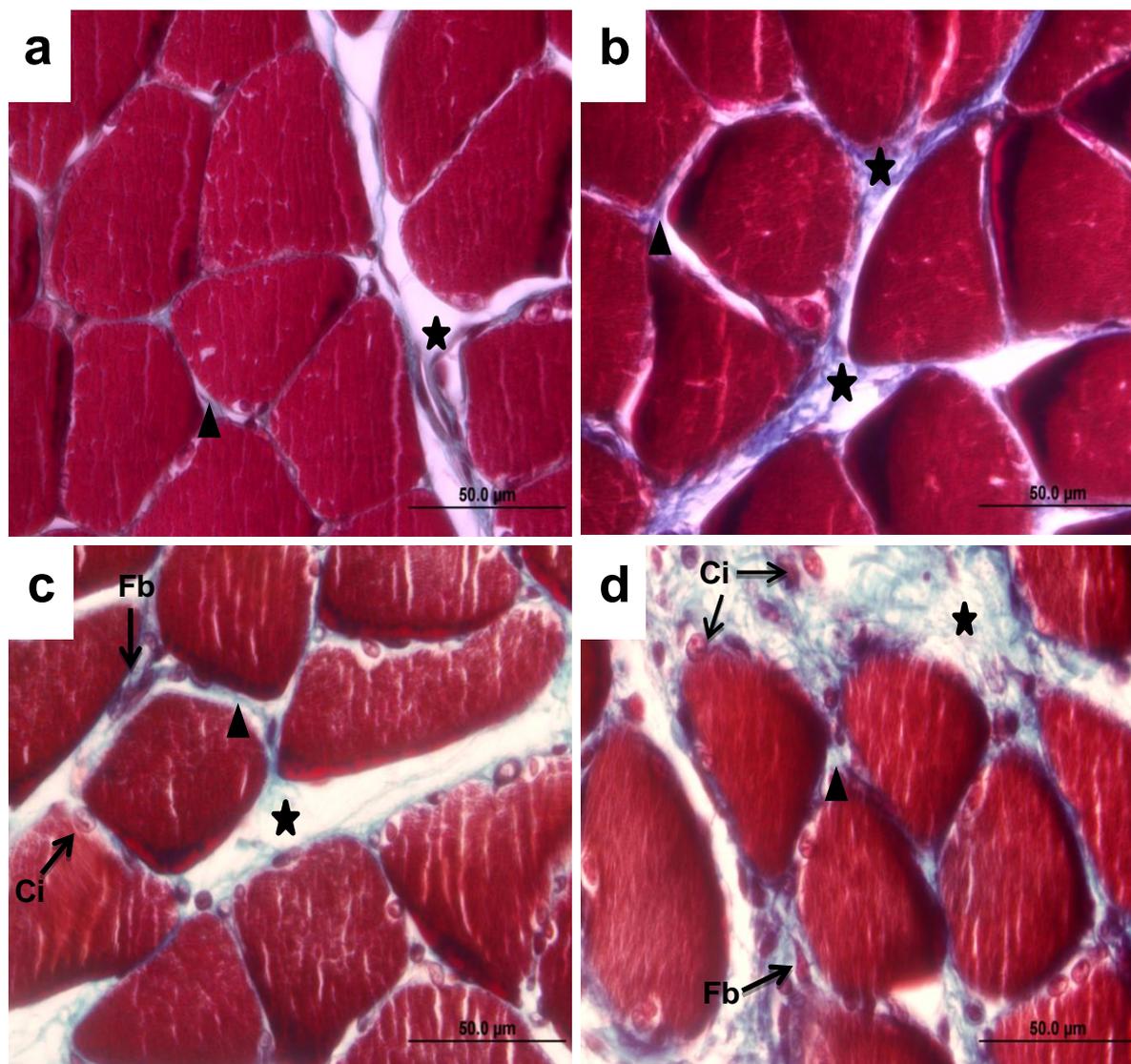


Figura 3 – Fotomicrografias do músculo sóleo de ratos Wistar, em secção transversal, coloração Tricrômico de Masson. (A) Grupo Controle e (B) Grupo Doença Periodontal evidenciando tecido conjuntivo característico, perimísio (estrela) e endomísio (cabeça de seta) com arranjo normal. (C) Grupo Imobilização e (D) Grupo Doença Periodontal e Imobilização apresentando aumento do tecido conjuntivo: perimísio (estrela) e endomísio (cabeça de seta), com presença de fibroblastos (Fb) e células inflamatórias (Ci).

ANEXO A – Parecer de Protocolo



Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Periodontite experimental como fator de risco da potencialização dos efeitos do imobilismo. Estudo com ratos", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 11/09/2015

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Luciana", written over a circular stamp.

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE

ANEXO B – Normas da Revista

Inflammation

Editor-in-Chief: Bruce N. Cronstein,
ISSN: 1573-2576 (electronic



ISSN: 0360-3997 (print version)
version), Journal no. 10753

Instructions for Authors

General

The Council of Biology Editors Style Manual should be used as the style guide for the preparation of manuscripts, particularly with respect to such matters as the use of abbreviations, numbers, and symbols.

Authorship Policy

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Page Charges

The journal makes no page charges. Color can be used without charge for the electronic edition of the journal but will appear in the printed version of the journal at the author’s expense. The cost for color reproduction in the printed journal is \$1,150.00 per article, charged to the author.

Title page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Alber, John, Daniel C. O'Connell, and Sabine Kowal. 2002. Personal perspective in TV interviews. *Pragmatics* 12: 257–271.

Article by DOI

Suleiman, Camelia, Daniel C. O'Connell, and Sabine Kowal. 2002. 'If you and I, if we, in this later day, lose that sacred fire...': Perspective in political interviews. *Journal of Psycholinguistic Research*.doi: 10.1023/A:1015592129296.

Book

Cameron, Deborah. 1985. *Feminism and linguistic theory*. New York: St. Martin's Press.

Book chapter

Cameron, Deborah. 1997. Theoretical debates in feminist linguistics: Questions of sex and gender. In *Gender and discourse*, ed. Ruth Wodak, 99-119. London: Sage Publications.

Online document

Frisch, Mathias. 2007. Does a low-entropy constraint prevent us from influencing the past? PhilSci archive. <http://philsci-archive.pitt.edu/archive/00003390>. Accessed 26 June 2007.

Journal names and book titles should be italicized.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

[EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

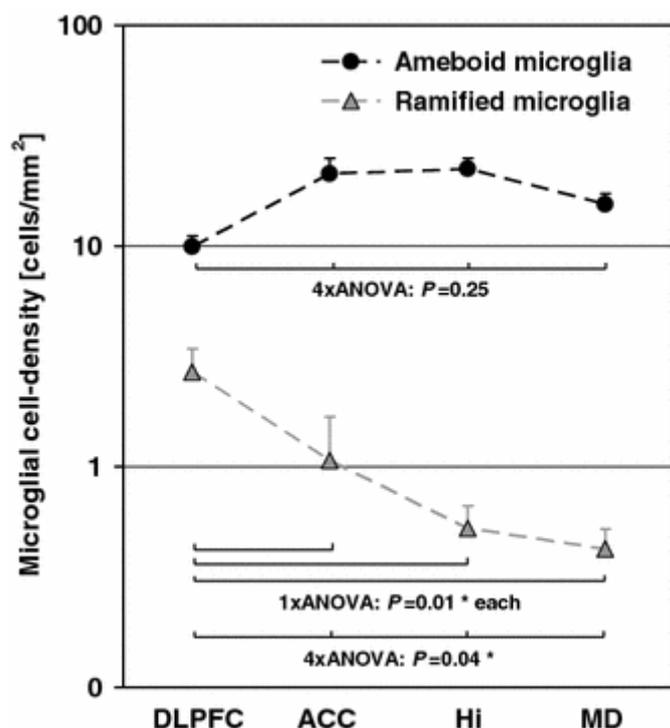
Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

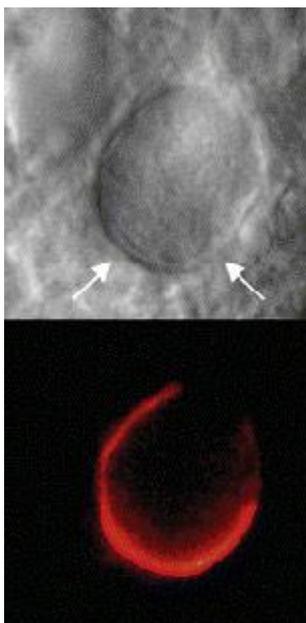
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

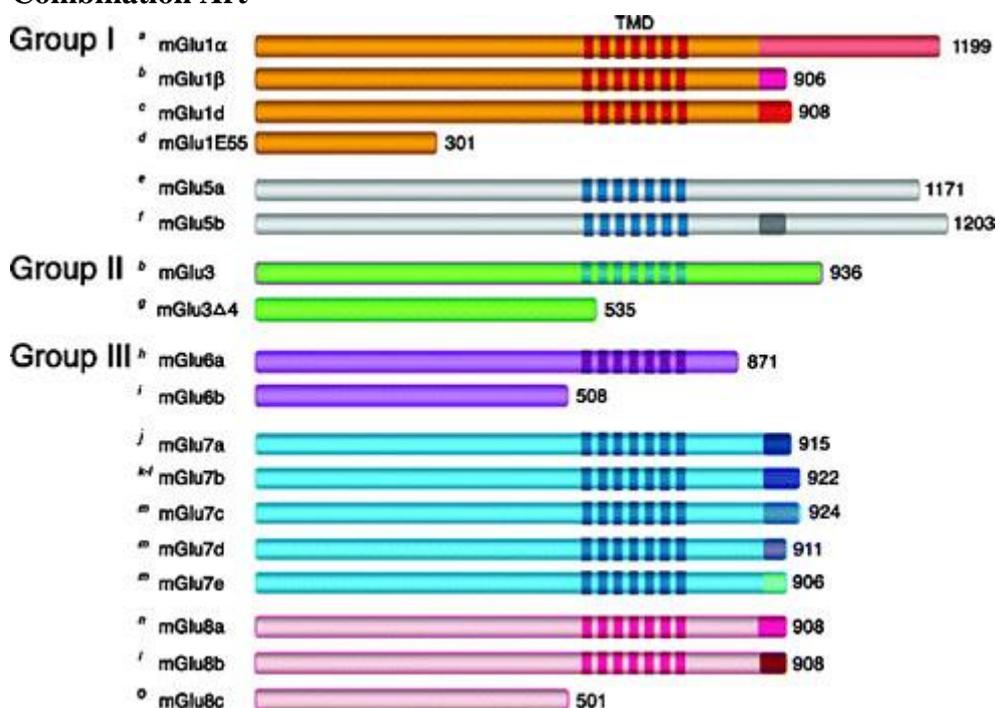


Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be

aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation

marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

Changes in authorship, or in the order of authors, are not accepted **after** the acceptance for publication of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance for publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire

scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

Changes in authorship, or in the order of authors, are not accepted **after** the acceptance for publication of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance for publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If

misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors.

In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants and/or animals

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

[Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](#)

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer’s online platform SpringerLink.

Open Choice

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

[Find more about the license agreement](#)

English Language Editing

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.

[English language tutorial](#)

[Nature Research Editing Service](#)

[American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.