

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL**

Bárbara Capitanio de Souza

**IMPACTO DA CONDIÇÃO PERIODONTAL NOS NÍVEIS SÉRICOS DE
MARCADORES INFLAMATÓRIOS E NO PROCESSO DE REPARO MUSCULAR
DE RATOS WISTAR TREINADOS E SEDENTÁRIOS**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

Porto Alegre, julho de 2013.

**IMPACTO DA CONDIÇÃO PERIODONTAL NOS NÍVEIS SÉRICOS DE
MARCADORES INFLAMATÓRIOS E NO PROCESSO DE REPARO MUSCULAR
DE RATOS WISTAR TREINADOS E SEDENTÁRIOS**

Bárbara Capitanio de Souza

**Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia, Nível Mestrado da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como pré-requisito final para a
obtenção do título de Mestre em Patologia
Bucal.**

Linha de Pesquisa: Epidemiologia,
Etiopatogenia e Repercussão das Doenças da
Cavidade Bucal e Estruturas Anexas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

Porto Alegre

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Adão e Leonice**,
pelo incentivo e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, **Juliana e André**,
pelo convívio e apoio em todos os momentos.

Ao meu namorado, **Marcelo**,
Pelo convívio neste período, dedicando seus finais de semana para me ajudar.
Obrigada por estar presente e compreender a minha ausência em alguns momentos.

Ao professor **Álvaro**,
Por ter sido o primeiro a acreditar.
Obrigada por me emprestar seus melhores pupilos.

André e Bruno, não tenho palavras para expressar o quanto sou grata pela ajuda.
Não teria conseguido realizar este projeto sem a colaboração de vocês.
Não vou me esquecer das horas de trabalho árduo e muitas risadas.

Aos colegas de mestrado (núcleo BM), **Grasi, Bernardo e Otávio**,
obrigada pelo convívio. Lembrarei sempre das nossas conversas.

Às meninas do laboratório de Patologia Bucal, **Isa, Cris e Ale**,
obrigada pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos professores da Patologia,
pela dedicação e seus ensinamentos.

À professora **Simone Marcuzzo**,
pela cedência do laboratório.

À veterinária **Lorena**,
pela ajuda na realização dos experimentos.

E aos demais que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho. Obrigada!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, **Marcelo Lamers**, por todo apoio e conhecimento que, brilhantemente, transmitiu, durante todo esse período de convivência.

Obrigada pela confiança em mim depositada ao assumir a orientação.

Obrigada por acreditar em uma proposta incomum.

A disponibilidade que sempre manifestou e a empatia com que recebeu as minhas ideias, foram os estímulos que me permitiram vencer as inseguranças deste processo.

Agradeço por ter ido além da orientação e, como conselheiro, contribuiu para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

RESUMO

O objetivo do estudo foi analisar as alterações no perfil inflamatório causado pela associação da doença periodontal e o exercício físico, em condições fisiológicas, e o papel desta interação sobre o processo de reparo muscular. Para isso, foram utilizados 24 ratos Wistar machos divididos em quatro grupos experimentais: Controle saudável e sedentário (SS); Controle saudável e treinado (TS); Com doença periodontal e sedentário (SC) e Com doença periodontal e treinado (TC). Foi realizada a indução de doença periodontal pela técnica de ligadura nos grupos SC e TC. Os grupos TS e TC realizaram um protocolo de exercício físico intenso em esteira rolante, durante 8 semanas. Ao longo das semanas do experimento, foram realizadas coletas de sangue para análise dos níveis séricos de citocinas inflamatórias e de leucócitos circulantes. Ao final do protocolo de exercício, foi realizada a indução de lesão muscular, por criolesão, nos músculos tibial anterior e gastrocnêmio de todos os animais, sendo os ratos sacrificados 3 dias após a criolesão. Foram realizadas análises morfológicas dos músculos com lesão induzida e dos músculos contralaterais, além do timo. Os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico SPSS versão 17.0 para *Windows*. Para realizar a comparação das médias entre os grupos, nos diferentes momentos analisados, foi utilizando o teste One-Way ANOVA e teste Post-Hoc de Tukey, com nível de significância de 0,05%. A doença periodontal foi capaz de modificar células e mediadores inflamatórios sistêmicos, tendo uma ação indireta no catabolismo muscular e no processo de reparo tecidual após lesão, sendo seu efeito potencializado, quando associada ao exercício físico.

ABSTRACT

The aim of the study was to analyze the changes in the inflammatory profile caused by the association of periodontal disease and exercise, under physiological conditions, and the role of this interaction on the process of muscle repair. For this, it was used 24 male Wistar rats which were randomly divided into four groups: healthy and sedentary (SS), healthy trained (TS); sedentary with periodontal disease (SC) and trained with periodontal disease (TC). Periodontal disease induction was performed in the SC and TC groups. TS and TC groups underwent a protocol of intense exercise on a treadmill for 8 weeks. Over the weeks of the experiment, blood samples were taken for analysis of serum inflammatory cytokines and circulating leukocytes. At the end of the exercise protocol it was induced muscle damage at the tibialis anterior and gastrocnemius muscles of all animals by cryoinjury, and the rats were sacrificed 3 days after the cryoinjury. Morphological analyzes were performed with muscle injury induced, undamaged contralateral muscles, and thymus. Data were analyzed using SPSS version 17.0 for Windows. To perform the comparison of means between groups in different time points analyzed, it was used One-Way ANOVA and post-hoc Tukey test with a significance level of 0.05%. It was observed that periodontal disease was able to modify white blood cells count and the systemic levels of inflammatory mediators, with an indirect action in muscle catabolism and tissue repair after injury, and its action is potentiated when combined with exercise.

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1	Mediadores Químicos Inflamatórios	9
2.1.1	Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)	11
2.1.2	Interleucina 6 (IL-6)	11
2.1.3	Interleucina 10 (IL-10)	11
2.2	Doenças Periodontais e Marcadores Inflamatórios	12
2.3	Exercício Físico e Marcadores Inflamatórios	14
2.4	Papel da Inflamação na Lesão e no Reparo Muscular	15
3	OBJETIVOS	17
3.1	Objetivo Geral	17
3.2	Objetivos Específicos	17
4	PRIMEIRO ARTIGO	18
5	SEGUNDO ARTIGO	39
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO	64
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO	73

1 APRESENTAÇÃO

A presente dissertação teve como foco de estudo a correlação dos níveis inflamatórios causado pela doença periodontal sobre o processo de reparo muscular de ratos treinados e sedentários. Para isso, animais com ou sem doença periodontal foram submetidos a exercício em esteira e avaliados quanto a parâmetros imunológicos, marcadores inflamatórios e estrutura histomorfológica de órgão linfático e tecido muscular.

Esta dissertação de mestrado está estruturada da seguinte maneira:

Revisão de literatura, enfatizando os principais pontos de discussão;

Primeiro artigo: **“EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E EXERCÍCIO FÍSICO INTENSO SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E HIPERTROFIA MUSCULAR”**. Referente ao efeito da ação conjunta da doença periodontal induzida e do exercício físico sobre os mediadores inflamatórios e sobre o metabolismo muscular. A ser submetido para o periódico *Mediators of Inflammation*.

Segundo artigo: **“INFLUÊNCIA DA DOENÇA PERIODONTAL ASSOCIADA AO EXERCÍCIO FÍSICO NOS NÍVEIS SÉRICOS DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E NO PROCESSO DE REPARO MUSCULAR”**. Referente à ação da doença periodontal sobre os mediadores inflamatórios e sobre o reparo muscular frente à lesão induzida. A ser submetido para o periódico *Mediators of Inflammation*.

Discussão integrada dos resultados obtidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A inflamação é um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis, apresentando como sinais clínicos característicos rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional (MEKORI e MERCALFE, 2000). A finalidade do processo inflamatório é remover o estímulo lesivo e iniciar a recuperação tecidual (PERDIGUERO et al., 2011). O sucesso na remoção do estímulo lesivo leva à conclusão do processo e término da reação inflamatória. Os mediadores da resposta inflamatória são variados e derivam tanto de precursores plasmáticos quanto de células, incluindo produtos de clivagem de precursores, produtos de cascatas de ativação, substâncias pré-formadas, radicais livres de oxigênio, óxido nítrico e derivados do ácido araquidônico (AUF DEM KELLER et al., 2013).

A reparação de um tecido danificado requer a ação coordenada de células inflamatórias e de tecidos específicos para restaurar a homeostase do local de lesão. Descobertas recentes revelam interações complexas entre o tecido muscular e células do sistema imunológico, que regulam o reparo tecidual (WEHLING, SPERNER e TIDBALL, 2001). Perturbações nos processos que normalmente regulam a ativação, proliferação ou diferenciação de células satélites, após a lesão, podem prejudicar a capacidade de regeneração do músculo. As células mielóides estimulam o início das fases de reparação através de mecanismos mediados por interleucinas (NGUVEN e TIDBALL, 2003). O prolongamento da presença destes reguladores está associado com uma fase tardia de diferenciação miogênica. Este evento é atenuado pela redução da população de células mielóides, através da liberação de citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10 (TIDBALL e VILLALTA, 2010). Deste modo, é importante o entendimento dos mecanismos potencializadores destes processos, como a influência de doenças crônicas com características infecto-inflamatórias.

2.1 Mediadores Químicos Inflamatórios

Citocinas são moléculas sinalizadoras secretadas principalmente por células do sistema imunológico, em resposta a agressões físicas, químicas ou biológicas. A secreção de citocinas é um evento breve e autolimitado que resulta no estímulo de diferentes respostas das células envolvidas na inflamação, sendo frequentemente citadas como modificadores da resposta biológica (Figura 1) (PETERSEN e PEDERSEN, 2005). Estas proteínas atuam sobre diferentes mecanismos como, por exemplo, ações pleiotrópicas (habilidade de uma citocina em

T ativadas, atração de macrófagos e identificação de mecanismos efetivos para fagocitose de microorganismos e promoção da eritropoiese (BRUUNSGRARD, 2005).

2.1.1 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

Trata-se de uma citocina mediadora e reguladora da imunidade inata, sintetizada principalmente por fagócitos mononucleares ativados. A função fisiológica principal desta citocina é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção e ativar estas células para erradicar os microorganismos patogênicos (FOLEY, 2008). Em diferentes concentrações, pode desempenhar ações específicas: em baixas concentrações plasmáticas, o TNF- α age sobre os leucócitos e sobre o endotélio para induzir inflamação aguda (MOORE et al., 1999) em concentrações moderadas, medeia os efeitos sistêmicos da inflamação, tais como febre, produção de proteínas de fase aguda (amilóide A e fibrinogênio) e produção de leucócitos pela medula óssea (GENCTOY et al., 2005). Em altas concentrações plasmáticas, causa anomalias patológicas do choque séptico, tais como inibição da contratilidade cardíaca, diminuição da resistência dos vasos sanguíneos, levando a formação de trombos e hipoglicemia severa (KELLER et al., 2004).

2.1.2 Interleucina 6 (IL-6)

Proteína produzida por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular, fibroblastos e outras células em resposta a microorganismos e a outras citocinas, especialmente IL-1 e TNF- α . Atua tanto no sistema imune inato quanto adaptativo, tendo como principais funções biológicas a síntese de proteínas na fase aguda da inflamação, estimulação da produção de neutrófilos e crescimento de linfócitos B, que se diferenciam em produtores de anticorpos (FISMAN et al., 2006). Aumentos séricos podem ocorrer em doenças inflamatórias e infecciosas. Pequenos aumentos crônicos nos níveis de IL-6 plasmático podem estar associados com obesidade, baixo nível de atividade física, resistência insulínica, diabetes tipo 2, doença cardiovascular, além de servir como preditor de mortalidade (BRESSON e VON HERRATH, 2011; CRANE et al., 2012).

2.1.3 Interleucina 10 (IL-10)

Importante citocina anti-inflamatória produzida por muitas populações de células, principalmente por monócitos e pelos linfócitos T auxiliares (Th2), que regula a resposta imune, inibindo reações alérgicas (AL-JANADI et al., 1996). Possui efeitos pleiotrópicos

sobre a imunorregulação e inflamação. Sua função biológica principal parece estar relacionada com o limite e terminação de respostas inflamatórias e com a regulação da proliferação e da diferenciação de várias células Imunológicas (CYPEL e RUBACHA, 2009).

A IL-10 diminui a expressão de citocinas, antígenos do MHC de classe II, e moléculas co-estimuladoras sobre macrófagos. Além disso, também aumenta a sobrevivência celular, proliferação e produção de anticorpos. Estudos recentes sugerem que a IL-10 também faz uma mediação imunoestimulatória ajudando a eliminar agentes infecciosos e não infecciosos (ALLAVENA et al., 1998).

A resposta imunológica desencadeada pelo organismo, frente a uma agressão, pode ocasionar alterações celulares e bioquímicas. Processos infecciosos, traumáticos ou agentes agressores promovem, em determinadas circunstâncias, uma ativação dos sistemas de defesa do organismo, principalmente aqueles relacionados ao sistema imune inato, levando à produção de grandes quantidades de mediadores inflamatórios, especialmente citocinas, como o fator de necrose tumoral, e as interleucinas. Diferentes eventos podem ser responsáveis pela alteração na resposta imunológica do nosso organismo. Dentre eles, destacam-se a doença periodontal e o exercício físico (KHANDPUR et al., 2013; BORASCHI et al., 2013).

2.2 Doenças Periodontais e Marcadores Inflamatórios

As doenças periodontais são doenças infecto-inflamatórias destrutivas dos tecidos moles e duros que circundam os dentes (LIU et al., 2009) Essas doenças ocorrem quando um desafio microbiano gera um desequilíbrio no processo saúde-doença, superpondo-se à resposta imuno-inflamatória do hospedeiro (LIU et al., 2010). A extensão e a gravidade da destruição dos tecidos são afetadas pela magnitude e pelas características da resposta do hospedeiro e podem ser moduladas por fatores ambientais, sistêmicos ou genéticos (EBERSOLE et al., 2008).

Embora os microrganismos tenham sido implicados como fator etiológico das doenças periodontais, a patofisiologia desta doença têm sido atribuída não somente aos produtos bacterianos, mas também aos mediadores químicos libertados pelas células hospedeiras, como resultado de reações inflamatórias e imunológicas (Tabela 1) (GOKUL, 2012). A doença periodontal pode modificar diferentes mediadores inflamatórios e, dentre estes mediadores, podemos citar as interleucinas as quais são substâncias secretadas por células de defesa e servem para ativar ou modular aspectos específicos da inflamação (TABA et al., 2005). A maioria destes compostos são pró-inflamatórios, ou seja, eles promovem ou retroalimentam o

processo inflamatório (TELES et al., 2009), sendo que o perfil de secreção de citocinas pode ser considerado como um indicador de risco da periodontite (DE HEENS, LOOS e VAN DER VELDEN, 2010).

Tabela 1: Indicação de mediadores inflamatórios e algumas de suas funções envolvidas na doença periodontal.

Mediador inflamatório	Função	Referência
TNF- α	Fase aguda da inflamação; Liberada na presença de periodontopatógenos; Associado com a reabsorção óssea; Recruta células progenitoras de osteoclastos; Induz apoptose de osteoblastos;	Wong et al., 2010 Behl et al., 2008
IL-6	Reduz o número de osteoblastos; Aumenta a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP);	Sims & Walsh, 2010 Maekawa et al., 2009 Sundararaj et al., 2009
IL-10	Resposta imunológica adaptativa; Baixos níveis séricos indicam uma exarcebação da DP; Inibição da reabsorção óssea;	Han et al., 2009 Lee et al., 2009

Pacientes com doença periodontal apresentaram níveis séricos de proteína c-reativa (PCR) e IL-6 significativamente superiores, quando comparados a pacientes saudáveis (SUN et al., 2009; NAKAJIMA et al., 2010) e, após a realização do tratamento da doença periodontal, observou-se uma redução significativa nos níveis destes marcadores inflamatórios (NAKAJIMA et al., 2010). Adicionalmente, os níveis séricos de IL-10 encontram-se aumentados na presença de periodontite associada a outras doenças sistêmicas (CORREA et al., 2010). Diferentes interleucinas, como IL-6, IL-8, IL-1 α e TNF- α , já demonstraram ter forte correlação positiva com os parâmetros clínicos da doença periodontal (TELES et al., 2009) embora aparentemente a IL-6 tenha papel mais importante. Adicionalmente, os níveis séricos de IL-6 e IL-10 encontram-se aumentados na presença de periodontite associada a outras doenças sistêmicas (CORREA et al., 2010).

Estudos que induziram a doença periodontal em ratos demonstraram que ocorre uma correlação entre o aumento das concentrações séricas de mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF- α e PCR com a presença de perda óssea quando comparado ao grupo sadio (BAIN et al., 2009; LIANG et al., 2010). Ao ser avaliada a interação de outras condições

sistêmicas como diabetes, tabagismo e doenças cardiovasculares com a periodontite, observa-se uma relação bilateral entre os fatores inflamatórios envolvidos (MAKINO et al., 2008; NISHIHARA et al., 2009; TAYLOR et al., 2010).

2.3 Exercício Físico e Marcadores Inflamatórios

A prática regular de atividade física associada a uma dieta balanceada pode ser importante fator na promoção da saúde. Todavia, a frequente realização de exercícios físicos de alta intensidade ou exaustivos pode aumentar a suscetibilidade a lesões, promover a fadiga crônica e *overtraining* (CRUZAT et al., 2007).

Após o exercício, há alterações de células inflamatórias circulantes. Inicialmente, neutrófilos e, posteriormente, monócitos e linfócitos são recrutados para o local de inflamação, onde produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) e enzimas proteolíticas para limpar e reparar o tecido lesado (STUPKA et al., 2000; NIEMAN et al., 2003). A infiltração de neutrófilos é estimulada por fatores quimiotáticos, incluindo prostaglandinas, fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL-1 β e IL-6). Essa resposta não é específica e, desse modo, pode acarretar lesão de células normais adjacentes ao local lesado. Além disso, a IL-6 também estimula a glândula hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que promove o aumento da liberação do hormônio cortisol a partir do córtex da glândula adrenal (NIEMAN et al., 2003; ROGERO, MENDES e TIRAPEGUI, 2005).

A relação entre exercício físico, citocinas e o sistema imune é relevante por diversas razões. Por exemplo, a síntese de citocinas por células do sistema imune é um dos mecanismos por meio do qual as imunidades inata e adquirida são ativadas ou amplificadas, fato que aumenta a imunocompetência e potencializa os efeitos do exercício (LEWIS, FAREL e WOOD, 2010). Além disso, o modelo do exercício pode auxiliar na elucidação do papel que as citocinas desempenham como reguladores locais e circulantes da função endócrina em indivíduos submetidos a treinamentos exaustivos. A frequência e a intensidade em que é realizado o exercício físico alteram o balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes (MACKINNOM, 2000).

Além da análise de células e mediadores inflamatórios, alguns órgãos também são foco de estudo da ação do exercício físico. O timo é um órgão linfático relacionado com a produção de linfócitos T e é frequentemente utilizado em análises adicionais para avaliar a ação direta ou indireta da atividade física sobre o sistema imunológico (SASSE et al., 2008). A atividade física intensa pode resultar em adaptações fisiológicas, incluindo a involução do

timo, que estaria associada a ativação crônica do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal. Alguns estudos apontam que a intensidade e a duração da atividade física podem estar relacionadas com a redução do peso do timo e a alterações morfológicas de seu parênquima (MORASKA et al., 2000, SASSE et al., 2008).

2.4 Papel da Inflamação na Lesão e Reparo Muscular

As lesões musculares podem ser causadas por contusões, estiramentos ou lacerações. Alguns aspectos musculares podem aumentar o risco do desenvolvimento de lesões. Músculos mais suscetíveis são tipicamente compostos por uma elevada percentagem de fibras musculares de tipo II, o que sugere que o perfil metabólico da fibra é importante na determinação das suas características funcionais e risco de lesão (ORCHARD e BEST, 2002).

O processo de lesão/reparo muscular envolve mecanismos fisiológicos e bioquímicos distribuídos em três fases: 1: destruição - caracterizada pela ruptura e posterior necrose das miofibrilas, pela formação do hematoma no espaço formado entre o músculo e pela proliferação de células inflamatórias; 2: reparo – consiste na fagocitose do tecido necrótico, na regeneração das miofibrilas e na produção concomitante do tecido cicatricial conectivo, assim como a neoformação vascular e no crescimento neural; 3: remodelação - período de maturação das miofibrilas regeneradas, de contração e de reorganização do tecido cicatricial e da recuperação da capacidade funcional muscular (HE e MARNEROS, 2013). As duas últimas fases de reparo e remodelação se sobrepõem e estão intimamente relacionadas.

As células inflamatórias desempenham um papel central no processo de reparo, durante a inflamação, subsequente à lesão. Três etapas da inflamação podem ser identificadas, de acordo com as diferenças entre as populações de células inflamatórias. Inicialmente, os neutrófilos invadem rapidamente o local de lesão e promovem a inflamação, liberando citocinas que podem atrair e ativar células inflamatórias adicionais. Em situações adversas, os neutrófilos podem prejudicar ainda mais o dano muscular, liberando radicais livres de oxigênio que podem danificar as membranas celulares (TIDBALL, 2005). Em um segundo momento, ocorre um aumento de macrófagos (M1), que irão remover as fibras musculares danificadas e os detritos celulares. Por fim, há um aumento de uma segunda subpopulação de macrófagos (M2) que são associados com o reparo do músculo (TIDBALL e VILALTA, 2010).

A resposta inflamatória envolvendo a liberação de citocinas tem como objetivo reparar o tecido lesionado. Citocinas, como o TNF- α e a IL-6, desempenham funções importantes

para o reparo do tecido lesionado (MORESI et al., 2008). A liberação de TNF- α facilita o influxo de neutrófilos para o local onde ocorreu o dano muscular, sendo responsável pela indução da fagocitose dos tecidos danificados (TIDBALL, 2005; TIDBALL e VILALTA, 2010). Prontamente, a IL-6 atua como uma citocina responsiva, modulando e ativando vias energéticas para o suporte do processo inflamatório (AUF DEM KELLER et al., 2013). Estudos recentes apontam que disfunções nas concentrações destas citocinas podem modificar o processo de miogênese. Altos níveis de TNF- α bloqueiam fortemente a miogênese do tecido muscular esquelético e estão associados com numerosas perturbações musculares (BAKKAR e GUTTRIDGE, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar as alterações no perfil inflamatório causado pela associação da doença periodontal e o exercício físico, em condições fisiológicas, e o papel desta interação sobre o processo de reparo muscular.

3.2 Objetivos Específicos

Analisar o papel da associação doença periodontal e exercício físico sobre:

- Modificações nos parâmetros fisiológicos dos animais;
- Alterações de células mielóides circulantes;
- Modificações nos níveis séricos dos mediadores inflamatórios IL-6, IL-10, TNF- α ;
- Alterações histomorfológicas degenerativas de órgão linfático;
- Alterações histomorfológicas do tecido muscular;

PRIMEIRO ARTIGO

A ser submetido ao periódico *Mediators of Inflammation*, fator de impacto 3,882 (2012).

O artigo está configurado de acordo com as normas do periódico.

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E EXERCÍCIO FÍSICO INTENSO SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E HIPERTROFIA MUSCULAR

Bárbara Capitanio de Souza¹, Marcelo Ekman Ribas¹, André Luiz Lopes², Bruno Costa Teixeira², Marcelo Lazzaron Lamers¹

1-Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

2-Laboratório de Pesquisa do Exercício (LAPEX) da Escola de Educação Física (ESEF) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

Autor para correspondência:

Marcelo Lazzaron Lamers

Endereço: Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2492, sala 503, CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, Telefone +55 51 33085011; Fax +55 51 33085003, email marcelo.lamers@ufrgs.br.

Resumo

Objetivo: Analisar o papel da doença periodontal (DP) associada ao exercício físico sobre mediadores inflamatórios e hipertrofia muscular. *Materiais e métodos:* 24 ratos wistar foram divididos em 4 grupos experimentais: Controle saudável e sedentário (SS); Controle saudável e treinado (TS); DP e sedentário (SC) e DP e treinado (TC). Foi realizada indução de DP nos grupos SC e TC. Após 30 dias da indução de DP, os grupos TS e TC iniciaram exercício físico em esteira. Foram realizadas coletas de sangue para a análise de IL-6, IL-10, TNF- α e leucograma. Os músculos tibial anterior e gastrocnêmio foram submetidos à análise morfológica. *Resultados:* Nos animais treinados, a DP diminuiu a resistência anaeróbia ao longo do protocolo de exercício. A DP foi capaz de modificar a contagem de leucócitos com o exercício físico apresentando um papel atenuante. A DP aumentou os níveis de IL-6, IL-10 e TNF- α , sendo que o exercício físico, por si só, modificou apenas os valores de IL-6. A associação entre exercício e DP foi responsável por uma diminuição significativa no perímetro das fibras musculares. *Conclusão:* A DP modificou os níveis séricos de marcadores inflamatórios e, quando associada ao exercício físico, influencia negativamente no processo de hipertrofia muscular.

Palavras-chave: Interleucinas, leucócitos, tibial, gastrocnêmio.

Abstract

Objective: To analyze the role of periodontal disease (PD) associated with physical exercise on inflammatory mediators and muscle hypertrophy. *Methods:* 24 Wistar rats were divided into four experimental groups: healthy sedentary (SS), healthy trained (TS), sedentary with PD (SC) and trained with DP (CT). PD was induced in groups SC and TC and after 30 days, TS and TC underwent treadmill exercise for 8 weeks. Blood samples were collected for analysis of IL-6, IL-10, TNF- α and leukocyte analysis, while the tibialis anterior and gastrocnemius underwent histomorphologic analysis. *Results:* In the trained animals, DP decreased anaerobic endurance throughout the exercise protocol. The DP was able to modify the leukocyte count and the treadmill training presented a mitigating role. DP increased levels of IL-6, IL-10 and TNF- α , and physical exercise only the increased values of IL-10. The association between exercise and DP was responsible for a significant decrease in the perimeter of the muscle fibers. *Conclusion:* The modified DP serum levels of inflammatory markers and, when combined with exercise, will negatively influence the process of muscle hypertrophy.

Keywords: Interleukins, leukocytes, tibialis, gastrocnemius.

1. Introdução

As doenças periodontais são doenças infecto-inflamatórias destrutivas dos tecidos moles e duros que circundam os dentes [1]. Essas doenças ocorrem quando um desafio microbiano gera um desequilíbrio no processo saúde-doença, superpondo-se à resposta imuno-inflamatória do hospedeiro [2]. A extensão e a gravidade da destruição dos tecidos são afetadas pela magnitude e pelas características da resposta do hospedeiro e podem ser moduladas por fatores ambientais, sistêmicos ou genéticos [3].

Dados epidemiológicos sugerem que as doenças periodontais podem estar associadas com outras condições sistêmicas patológicas [1, 4, 5]. Além disso, é possível encontrar algumas evidências de que infecções de origem odontogênica possuem relação com o desenvolvimento de danos em musculatura causados pela exacerbação da resposta imunológica, a qual é capaz de gerar destruição e alterações na expressão da miosina [6, 7, 8].

A atividade física regular tem demonstrado ter uma relação de proteção contra várias doenças crônicas, incluindo a redução no risco de desenvolvimento de periodontite [9, 10]. Diferentes tipo e cargas de exercício físico podem resultar em uma depressão da imunidade, com a conseqüente elevação dos hormônios de estresse, principalmente o cortisol, e na alteração das concentrações de interleucinas como IL-6 e IL-10 [11, 12].

A massa muscular é resultado do equilíbrio entre síntese e catabolismo protéico. Os fatores anabólicos incluem fatores físicos e químicos. Os fatores catabólicos incluem desuso muscular, estresses oxidativo, citocinas pró-inflamatórias, acidose e hormônios glicocorticóides [13]. Alterações estruturais como a redução de massa e fibras musculares estão associadas à fraqueza muscular, redução da força e da resistência muscular [14, 15]. Estes apontamentos indicam que pode haver uma íntima relação entre os processos catabólicos musculares e modificações de mediadores inflamatórios.

Devido ao fato da doença periodontal e o exercício físico causarem alterações sistêmicas em marcadores inflamatórios bem como sobre o metabolismo muscular, o objetivo do estudo foi analisar o papel da associação entre doença periodontal associada e exercício físico sobre mediadores inflamatórios e hipertrofia muscular.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização e Distribuição Amostral

O protocolo experimental segue as regras da Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei nº 11.794 (08.10.2008) e foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFRGS (nº 19728). Foram utilizados 24 ratos Wistar machos de 60 dias, pesando em média 250g e provenientes do biotério central da UFRGS. Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polipropileno (três animais em cada gaiola), recebendo ração balanceada para roedores e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo fotoperiódico de 12 horas claro/escuro. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, por meio de randomização estratificada para o peso, com 6 ratos em cada grupo: grupo 1) Controle saudável e sedentário (SS); grupo 2) Controle saudável e treinado (TS); grupo 3) Com doença periodontal e sedentário (SC) e grupo 4) Com doença periodontal e treinado (TC).

2.2. Indução de Doença Periodontal

A indução da doença periodontal foi realizada pela técnica da ligadura [16]. Um operador devidamente treinado realizou o procedimento. Os animais foram sedados previamente à anestesia via IP com cloridrato de xilazina (1 mg/kg) e foram anestesiados via IP com pentobarbital sódico (15 mg/kg). Após a anestesia, foi acondicionado um fio de sutura de seda estéril 4.0 na região cervical dos segundos molares superiores e dos primeiros molares inferiores. Este procedimento foi realizado nos grupos SC e TC.

2.3. Protocolo de Exercício Físico

O protocolo de exercício teve início a partir do trigésimo dia após a colocação das ligaduras e teve a duração de cinco dias por semana, durante oito semanas. A atividade física de escolha foi a corrida em esteira rolante. O protocolo de exercícios foi adaptado do protocolo de estudo para verificação do limiar anaeróbio de ratos, e consistiu de exercícios físicos diários, com aumento gradual das velocidades. A disposição da duração do exercício assim como a velocidade foi adaptada do estudo correspondente e estão indicadas na tabela 1 [17]. Os animais foram pesados, ao longo das semanas de treinamento.

2.4. Coleta de Sangue

Foram realizadas três coletas de sangue da veia caudal em diferentes momentos: t0 = antes do início do exercício; t1 = ao final da quarta semana do protocolo de exercício; t2 = ao final da oitava semana do protocolo de exercício. As amostras de sangue (1ml) foram centrifugadas (4°C, 3.200 xg, 10 min), sendo o soro conservado a -80°C até o momento da análise. A quantificação dos marcadores inflamatórios (IL-6, IL-10 e TNF- α) no soro foi realizada pelo método ELISA (*Enzyme - linked immunosorbent assay*) (BD Biosciense, San Diego, CA). A análise de sangue foi realizada por alteração de absorvância no comprimento de onda 450nm, com correção para 560nm, utilizando um leitor de ELISA (xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad, Hercules , CA).

2.5. Esfregação Sanguíneo

Durante a coleta de sangue, foram realizadas lâminas de esfregação sanguíneo, as quais foram secas e coradas com corante hematológico Panótico (RENYLAB QUIM. FARM. LTDA, Barbacena – MG). A contagem de leucócitos, em valores relativos (%), foi realizada por um único observador cego e calibrado antes e durante o estudo (Kappa interexaminador - 0,8 e intraexaminador – 0,882). A técnica de análise utilizada foi o Método de Schilling [18]. As análises foram realizadas com microscópio binocular Olympus Optical Co., modelo CH30RF100, no aumento de 400x.

2.6. Avaliação de Lactato

Durante o treinamento dos animais, amostras de sangue (25 μ l) foram dispensadas diretamente sobre a fita coletora do lactímetro (Accutrend[®] Roche, Basel, Switzerland) para o estabelecimento da lactacidemia.

2.7. Obtenção das Amostras

Após o sacrifício dos animais com dose anestésica, os músculos tibial anterior e gastrocnêmio foram coletados, fixados em solução de methacarn (metanol 60%, ácido acético 10% e clorofórmio 30%, 4 h, 4°C), desidratados, diafanizados e incluídos em parafina (Paraplast[®] Oxford, St. Louis, Mo., USA). Cortes de 5 μ m foram obtidos em micrótomo e submetidos a coloração por hematoxilina e eosina (HE), seguido de desidratação, diafanização e montagem em resina.

2.8. Análise morfológica do músculo

Foram selecionadas aleatoriamente três lâminas de cada músculo e, em cada corte, foram escolhidas três áreas de leitura, onde se observavam cortes transversais da fibra muscular. As imagens foram capturadas por um sistema de câmera no aumento de 400x. As análises foram realizadas com no mínimo 200 fibras para cada animal. Sobre as imagens, foi utilizado um sistema teste de linhas paralelas, para a determinação do perímetro médio das fibras musculares (Figura Suplementar). A fórmula $b = \pi/2 \times d \times i$ foi utilizada para o cálculo do perímetro [19, 20], onde b corresponde ao perímetro, d corresponde à distância entre as linhas e i corresponde ao número de intersecções entre as fibras e as linhas.

2.9. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 17.0 para *Windows*. Foi realizado teste de normalidade para os dados encontrados. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão e porcentagens. Para realizar a comparação das médias entre os grupos, nos diferentes momentos analisados, foi utilizando o teste One-Way ANOVA e teste Post-Hoc de Tukey, com nível de significância de 0,05.

3. Resultados

3.1. Parâmetros Fisiológicos e Morfologia Muscular

Todos os animais apresentaram aumento no peso durante o período analisado, sendo que os animais dos grupos sedentários apresentaram as maiores variações de peso quando comparados aos animais treinados (Figura 1A). A doença periodontal não influenciou na variação do peso, quando comparado ao seu respectivo grupo experimental (sedentários ou treinado).

A análise da lactacidemia demonstrou que os ratos sedentários apresentavam um nível basal de geração de lactato, a qual não foi influenciada pela doença periodontal (Figura 1B). Durante o exercício físico, os animais treinados apresentavam um aumento na geração de lactato, o qual foi mais expressivo no grupo com doença periodontal. Estes dados sugerem que a doença periodontal atuou como um fator negativo de modificação da adaptação ao treinamento em esteira.

A análise do perímetro das fibras musculares demonstrou que o exercício físico em esteira levou a uma hipertrofia muscular tanto do músculo gastrocnêmio quanto do músculo tibial anterior (Figura 2A), quando comparado os grupos treinados aos sedentários. A indução da doença periodontal não alterou o tamanho da fibra muscular no grupo sedentário, porém a associação entre exercício físico e doença periodontal foi responsável por uma diminuição significativa no perímetro das fibras do músculo gastrocnêmio (Figura 2E), quando comparado com os demais grupos experimentais. Para o músculo tibial anterior não foram observadas diferenças significativas entre os grupos SS, SC; porém, a doença periodontal impediu a hipertrofia da fibra muscular no grupo treinado (Figura 2I). A análise histológica demonstrou que não ocorreram alterações significativas no perfil inflamatório local.

3.2. Análise do Leucograma e dos Níveis Séricos de Citocinas

Os animais do grupo sedentário sem doença periodontal apresentaram uma predominância nos níveis de linfócitos circulantes ($70\% \pm 2,66\%$, t0), sendo que o exercício físico associado à doença periodontal induzida aumentou esta proporção ($76,17\% \pm 7,23\%$, $p < 0,05$, t1) após 4 semanas de treinamento. A indução de doença periodontal, tanto no grupo sedentário quanto no grupo treinado, esteve associada a um aumento significativo de linfócitos (71% e 72,42%, respectivamente), quando comparado aos seus respectivos grupos controles, após 8 semanas (Figura 3A). Os níveis de monócitos circulantes apresentaram variação apenas no grupo com doença periodontal no início do estudo (Figura 3C), voltando a valores semelhantes ao controle nos demais tempos.

Na análise dos leucócitos granulócitos, foi observado que após 30 dias da indução da doença periodontal aumenta os níveis de neutrófilos circulantes (t0) quando comparado ao grupo controle (Figura 3B). Ao longo do experimento, o exercício físico ocasionou uma redução destes valores, quando associado à doença periodontal. Os níveis de eosinófilos estavam aumentados no início do treinamento (30 dias após a indução de DP), sendo que o exercício físico exacerbou este efeito após 4 semanas de treinamento (t1) (Figura 3D). Os níveis de basófilos, não apresentaram variação significativa entre os grupos experimentais (dados não mostrados).

Os níveis plasmáticos de IL-6 (Figura 4A) mostram que após 4 semanas de exercício ocorre um aumento nos níveis de IL-6, para os animais com doença periodontal e treinados, quando comparado aos demais grupos, os quais se mantêm após 8 semanas de exercício. Os grupos com doença periodontal apresentaram níveis superiores de IL-6 em todos os momentos analisados, sendo que a associação da doença periodontal com o exercício físico

apresentou efeito aditivo. A análise dos níveis plasmáticos de TNF- α (Figura 4B) demonstra que ocorreu diferença significativa entre os grupos sedentários e treinados após 8 semanas de exercício físico. A indução da doença periodontal ocasionou um aumento significativo de TNF- α no grupo sedentário, onde observa-se uma tendência de aumento com a cronicidade da doença periodontal. A análise dos níveis plasmáticos de IL-10 (Figura 4C) demonstra que inicialmente não ocorreram diferenças significativas entre os grupos sedentários e treinados, porém, após 8 semanas de treinamento, ocorre um aumento nos níveis de IL-10. A indução da doença periodontal levou a um aumento significativo de IL-10 (t2), sendo que o exercício, por si só, físico não alterou esta interleucina.

4. Discussão

A doença periodontal é uma doença inflamatória crônica, capaz de modificar diferentes parâmetros fisiológicos [21]. Neste estudo, demonstramos que a doença periodontal influencia o processo metabólico que envolve a hipertrofia muscular. A dosagem de lactato, utilizado como referência sobre a intensidade de treinamento e como marcador de hipóxia tecidual, apresentou-se elevada nos grupos com doença periodontal submetidos ao treinamento físico. A hipóxia tecidual pode ser decorrente da associação entre distribuição heterogênea do fluxo sanguíneo microvascular, baixo fluxo sistêmico (hipoxia isquêmica) e falência no metabolismo celular [22,23]. Estes dados corroboram com outros encontrados na literatura, os quais mostram uma relação entre doença periodontal e variação dos níveis de lactato [24].

Os dados analisados indicam que o exercício físico possibilitou um aumento no perímetro de fibra muscular, para os animais sem doença periodontal. Contudo, a doença periodontal influenciou negativamente no processo de hipertrofia muscular, uma vez que os animais com ligadura apresentaram um perímetro de fibra muscular reduzido. Além disso, pode ser observado um efeito adicional na redução do perímetro da fibra muscular, para os animais com doença periodontal e que realizaram o exercício físico.

As fibras musculares têm capacidade de alterar suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com os estímulos a que são submetidas, com o resultado refletindo na quantidade ou tipo das proteínas musculares. Esta capacidade adaptativa envolvendo diferentes componentes da fibra diz respeito à plasticidade muscular [25, 26, 27].

Aparentemente, as fibras musculares do tipo II são mais susceptíveis aos efeitos da doença periodontal, uma vez que o gastrocnêmio foi mais afetado. As características histológicas, como quantidade e tipo de fibra, e o recrutamento do músculo para a atividade desenvolvida possuem relação direta com os resultados encontrados [28, 29], uma vez que o músculo gastrocnêmio apresenta uma maior quantidade de fibra tipo II do que o músculo tibial anterior [30]. Além disso, a carga de esforço gerada pelo exercício físico em esteira parece ter uma atuação maior nesse músculo [31].

Diferentes tipos e cargas de exercício físico podem provocar alterações distintas nos parâmetros imunes. Alguns estudos vêm demonstrando que o exercício físico moderado (<60% do $VO_{2máx}$) parece estar relacionado ao aumento da resposta dos mecanismos de defesa orgânica, enquanto que o exercício físico mais intenso e prolongado (>65% do VO_{2max}) ou o treino excessivo parecem enfraquecê-la [32, 33, 34]. Adicionalmente, o próprio perfil inflamatório pode influenciar no tamanho das fibras musculares, bem como no seu desempenho. Por exemplo, alterações nos níveis de eosinófilos podem influenciar a hipertrofia do músculo esquelético [13]. O modelo utilizado neste estudo indica um treinamento moderado, o qual não alterou drasticamente o leucograma destes animais. A indução da doença periodontal *per se* foi capaz de modificar os valores de neutrófilos e eosinófilos circulantes. A associação entre exercício físico e a doença periodontal exacerbou os níveis de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, sugerindo indiretamente uma maior responsividade da musculatura à resposta imunológica e consequente diminuição na menor hipertrofia muscular observada neste grupo experimental. Estes dados são reforçados por outros trabalhos [13, 35], que ressaltam a importância da adequada interação das células mielóides e dos mediadores inflamatórios para o crescimento normal da musculatura.

Alterações no perfil do leucograma podem estar associadas a modificações nos mediadores inflamatórios os quais podem influenciar o comportamento muscular. O modelo de exercício físico utilizado neste estudo não alterou, por si só, os valores de IL-6, IL-10, e TNF- α . Por outro lado, a indução de doença periodontal influenciou o aumento dos mediadores inflamatórios (IL-6 e TNF- α) [36], indicando um perfil pró-inflamatório. Adicionalmente, parece haver um efeito sinérgico da doença periodontal e do exercício físico sobre os níveis de IL-10 ao final das 8 semanas de treinamento. Estudos com animais e humanos mostram que o aumento de IL-6 inibe o efeito anabólico do IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) no músculo, e que altas concentrações de IL-6 e baixas concentrações de IGF-1 contribuem para o agravamento da sarcopenia [15]. A produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α é provavelmente a causa mais comum da depleção do

tecido muscular. Citocinas ativam a transcrição do fator nuclear Kapa-B (FN- κ B), o que resulta em diminuição da síntese proteica muscular [37]. O TNF- α é altamente específico para estimular a proteólise da miosina de cadeia pesada. Além disso, citocinas estimulam a liberação de cortisol e catecolaminas a partir da glândula adrenal. Há também, uma forte relação entre a inflamação e anormalidades homeostáticas, tais como a síndrome da resistência à insulina [14, 37].

Os processos metabólicos musculares são suscetíveis às várias condições patológicas mediadas por citocinas inflamatórias. Estas desempenham um papel importante tanto na indução da perda de massa muscular como no bloqueio do reparo após lesão tecidual [38,39]. Em particular, o TNF- α é a principal citocina envolvida na patogênese de alterações musculares [37, 38, 41]. A exposição prolongada de TNF- α é conhecida por bloquear a diferenciação de células e a regeneração do músculo [38, 42]. Além disso, a IL-10 também tem uma ação importante no processo metabólico muscular, pois age na regulação das alterações do fenótipo de macrófagos, durante o crescimento do músculo e na regeneração após a lesão. A IL-10 auxilia na redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, contribui para a redução da lise celular causada por macrófagos de classe 1 (M1) e estimula o aumento de macrófagos de classe 2 (M2), que possuem capacidade de promover a proliferação de células satélites [35, 43, 44].

5. Conclusão

A doença periodontal foi capaz de modificar células e mediadores inflamatórios sistêmicos, tendo uma ação indireta no catabolismo muscular, sendo sua ação potencializada, quando associada ao exercício físico.

Referências

1. K. Z. Liu, X. M. Xiang, A. Man et al. “ In vivo determination of multiple indices of periodontal inflammation by optical spectroscopy”. *J Periodontal Res*, vol. 44, no. 1, pp.117-124, 2009.
2. L. Liu, C. Li, C. Cai et al. “Cyclophilin A (CypA) is associated with the inflammatory infiltration and alveolar bone destruction in an experimental periodontitis”. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 391, no. 1, pp.1000-1006, 2010.

3. J. L. Ebersole, M. J. Steffen, M.A Reynolds et al. "Differential Gender Effects of a Reduced Calorie Diet on Systemic Inflammatory and Immune Parameters in Nonhuman Primates". *J Periodontal Res*, vol. 43, no. 5, pp.500-507, 2008.
4. J. L. Ebersole, J. Stevens, M. J. Steffen et al. "Systemic endotoxin levels in chronic indolent periodontal infections". *J Periodontal Res*, vol. 45, n0. 1, pp.1-7, 2010.
5. J. A. Keelan, P. M. Wong, P. S. Bird et al. "Innate inflammatory responses of human decidual cells to periodontopathic bacteria". *Am J Obstet Gynecol*, vol. 202, no. 5, pp.1-11, 2010.
6. A. C. Canettieri, F. Y. Kretchetoff, C. Y. Koga Ito et al. "Production of monoclonal antibodies against Streptococcus mutans antigens". *Braz Oral Res*, vol. 20, no. 4, p.297-302, 2006.
7. K. Wada, Y. Kamisaki. "Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases--from molecular mechanisms to clinical cases: Involvement of Porphyromonas gingivalis in the development of human aortic aneurysm". *J Pharmacol Sci*, vol. 113, no. 2, p.115-119, 2010.
8. C. W. Tseng, P. Kyme, J. Low et al. "Staphylococcus aureus Pantone-Valentine leukocidin contributes to inflammation and muscle tissue injury". *Plos One*, vol. 4, no. 7, pp.e6387, 2009.
9. M. S Al-Zahrani, E. A. Borawski, N. F. Bissada. "Periodontitis and three health-enhancing behaviors: maintaining normal weight, engaging in recommended level of exercise, and consuming a high-quality diet". *J Periodontol*, vol. 76, no. 8, pp.1362-1366, 2005.
10. A. E. Sander, G. D. Slade, T. R. Fitzsimmons et al. "Physical activity, inflammatory biomarkers in gingival crevicular fluid and periodontitis". *J Clin Periodontol*, vol. 66, no. 5, pp.388-395, 2009.
11. D. Keast, K. Cameron, A. R. Morton. "Exercise and the immune response". *Sports Med*, no. 5, pp. 248-267, 1988.
12. N. P. Walsh, M. Gleeson, R. J. Shephard et al. "Position statement. Part one: Immune function and exercise". *Exerc Immunol Rev*, no. 17, pp.6-63, 2011.
13. J. G. Tidball, S. A. Villalta. "Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 298, no. 5, pp. 1173-87, 2010.
14. R. Krogh-Madsen, P. Plomgaard, K. Moller et al. "Influência do TNF -alfa e IL-6 sobre a sensibilidade à insulina infusões e expressão de IL-18 em humanos". *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 291, no. 1, PP. E108-14, 2006.
15. P. Muñoz-Cánoves, C. Scheele, B. K. Pedersen et al. "Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword?" *FEBS J*. 2013. [Epub ahead of print]

16. T. Abe, G. Hajishengallis. "Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice". *J Immunol Methods*, 2013. [Epub ahead of print]
17. M. B. de Araújo, F. B. M. Gobatto, F. A. Voltarelli et al. "Running training effects in different intensities on the aerobic capacity and lactate production by the muscle of wistar rats". *Rev Bras Med Esporte*, vol. 15, no. 5, pp. 365-69, 2009.
18. I. Ghermati, A. Corbin, L. Chabanne et al. "Canine large granular lymphocyte leukemia and its derived cell line produce infectious retroviral particles". *Vet Pathol*, vol. 37, no. 4, pp. 310-7, 2000.
19. B. S. Nedergaard, M. Ladekarl, H. F. Thomsen et al. "Low density of CD3+, CD4+ and CD8+ cells is associated with increased risk of relapse insquamous cell cervical cancer". *BR J Cancer*, vol. 97, no. 8, pp. 1135-8, 2007.
20. C. N. Battlehner. How to measure the increase in elastic system fibres in the lamina propria of the uterine cervix of pregnant rats. *J Anat.* 2003; 203:405–418.
21. V. Morath, M. Keuper, M. Rodriguez-Franco et al. "Semi-automatic determination of cell surface areas used in systems biology". *Front Biosci*, no. 5, pp. 533-45, 2013.
22. R. P. Teles, V. Likhari, S. S. Socransky et al. "Salivary Cytokine Levels in Chronic Periodontitis and Periodontally Healthy Subjects. A cross-sectional Study". *J Periodontal Res*, vol. 44, no. 3, pp.411-417, 2009.
23. C. Thomas, D. J. Bishop, K. Lambert et al. "Effects of acute and chronic exercise on sarcolemmal MCT1 and MCT4 contents in human skeletal muscles: current status". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 302, no. 1, pp.1-14, 2012.
24. H. Gatterer, J. Greiberger, M. Philippe et al. "Short-term supplementation with alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural does not prevent the hypoxia induced decrease of exercise performance despite attenuation of oxidative stress". *Int J Sports Med*, vol. 34, no. 1, pp. 1-7, 2012.
25. W. Y. Loo, Y. Yue, C. B. Fan et al. "Comparing serum levels of cardiac biomarkers in cancer patients receiving chemotherapy and subjects with chronic periodontitis". *J Transl Med*, Suppl 1:S5, 2012.
26. K. M. Baldwin, F. Haddad. "Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle". *J Appl Physiol*, vol. 90, no. 1, pp. 345-57, 2001.
27. D. Pette. "Training effects on the contractile apparatus". *Acta Physiol Scand*, vol.162, no. 3, pp. 367-76, 1998.
28. H. Pilegaard, G. A. Ordway, B. Saltin et al. "Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise". *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 279, no. 4, pp. e806-14, 2000.

29. M. D. Delp, C. Duan. "Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle". *J Appl Physiol*, vol. 80, no. 1, pp. 261-70, 1996.
30. R. S. Staron, W. J. Kraemer, R. S. Hikida et al. "Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats". *Histochem Cell Biol*, vol. 111, no. 2, pp. 117-23, 1999.
31. W. H. Foster, J. G. Tidball, Y. Wang. "p38 γ activity is required for maintenance of slow skeletal muscle size". *Muscle Nerve*, vol. 45, no. 2, pp. 266-273, 2012.
32. F. Macaluso, N. E. Brooks, C. U. Niesler et al. "Satellite cell pool expansion is affected by skeletal muscle characteristics". *Muscle Nerve*, vol. 48, no. 1, pp. 109-16, 2013.
33. D. Keast, K. Cameron, A. R. Morton. "Exercise and the immune response". *Sports Med*, no. 5, pp. 248-67, 1988.
34. R. Brines, L. Hoffman-Goetz, B. K. Pedersen. "Can you exercise to make your immune system fitter?". *Immunol Today*, no. 17, pp. 252-54, 1996.
35. J. G. Cannon. "Exercise and resistance to infection". *J Appl Physiol*, no. 74, pp. 973-81, 1993.
36. B. Deng, M. Wehling-Henricks, S. A. J. Villalta. "IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration". *SAJ Immunol*, vol. 189, no. 7, pp. 3669-80, 2012.
37. R. P Teles, V. LikhariV, S. S. Socransky et al. "Salivary Cytokine Levels in Chronic Periodontitis and Periodontally Healthy Subjects. A cross-sectional Study". *J Periodontal Res*, vol. 44, no. 3, pp. 411-417, 2009.
38. I. A. Clark. "How TNF was recognized as a key mechanism of disease". *Cytokine Growth Factor Rev*, no. 18, pp. 335-43, 2007.
39. D. C. Guttridge, M. W. Mayo, L. V. Madrid et al. "NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia". *Science*, no. 289, pp. 2363-66, 2000.
40. V. Moresi, A. Pristera, B. M Scicchitano et al. "Tumor necrosis factor-alpha inhibition of skeletal muscle regeneration is mediated by a caspase-dependent stem cell response". *Stem Cells*, no. 26, pp. 997-1008, 2008.
41. S. Hodgetts, H. Radley, M. Davies et al. "Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF alpha function with Etanercept in mdx mice". *Neuromuscul Disord*, no. 16, pp. 591-602, 2006.
42. B. Perniconi, M. C Albertini, L. Teodori et al. "A meta-analysis on a therapeutic dilemma: to exercise or not to exercise in cachexia". *Basic Appl Myol*, no. 18, pp. 105-120, 2008.

43. D. Coletti, E. Yang, G. Marazzi et al. "TNF α inhibits skeletal myogenesis through a PW1-dependent pathway by recruitment of caspase pathways". *EMBO J*, no. 21, pp. 631-42, 2002.
44. S. A. Villalta, H. X. Nguyen, B. Deng et al. "Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy". *Hum Mol Genet*, vol. 18, no. 3, pp. 482-96, 2009.
45. S. A. Villalta, C. Rinaldi, B. Deng et al. "Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype". *Hum Mol Genet*, vol. 20, no. 4, pp. 790-805, 2011.

Tabela 1: Protocolo de exercício. Os animais foram submetidos a treinamentos diários com aumento gradual na intensidade e no tempo de realização.

Semana	Velocidade (m/min)	Tempo (min)
1º	5	20
2º	10	20
3º	10	30
4º	15	30
5º	15	30
6º	20	40
7º	20	40
8º	25	40

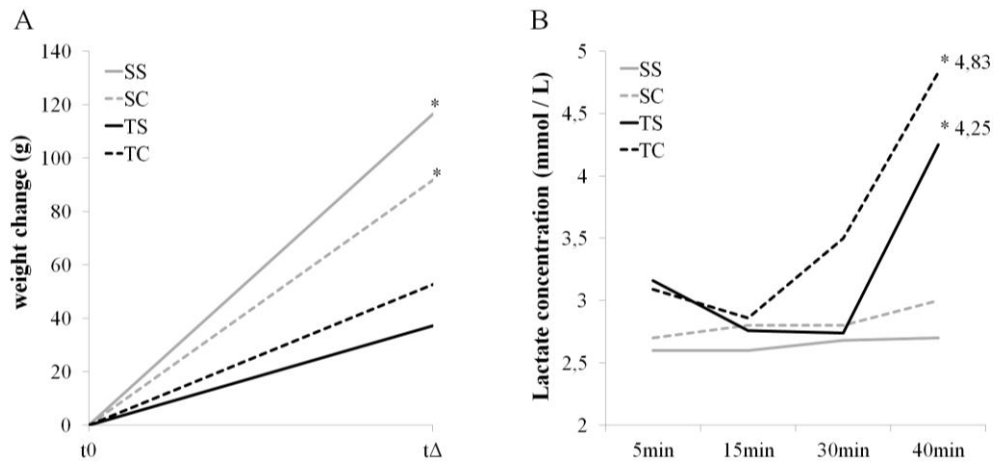


Figura 1: Doença periodontal induz alterações em parâmetros fisiológicos. (A) Animais dos grupos sedentários apresentaram as maiores variações de peso quando comparados aos animais treinados. (B) Animais treinados apresentavam um aumento na geração de lactato, o qual foi mais expressivo no grupo com doença periodontal. Teste One-Way ANOVA e teste Post-Hoc de Tukey, com nível de significância de 0,05%, n=6. SS: sedentários e sem doença periodontal, SC: sedentário e com doença periodontal, TS: treinado e sem doença periodontal, TC: treinado e com doença periodontal.

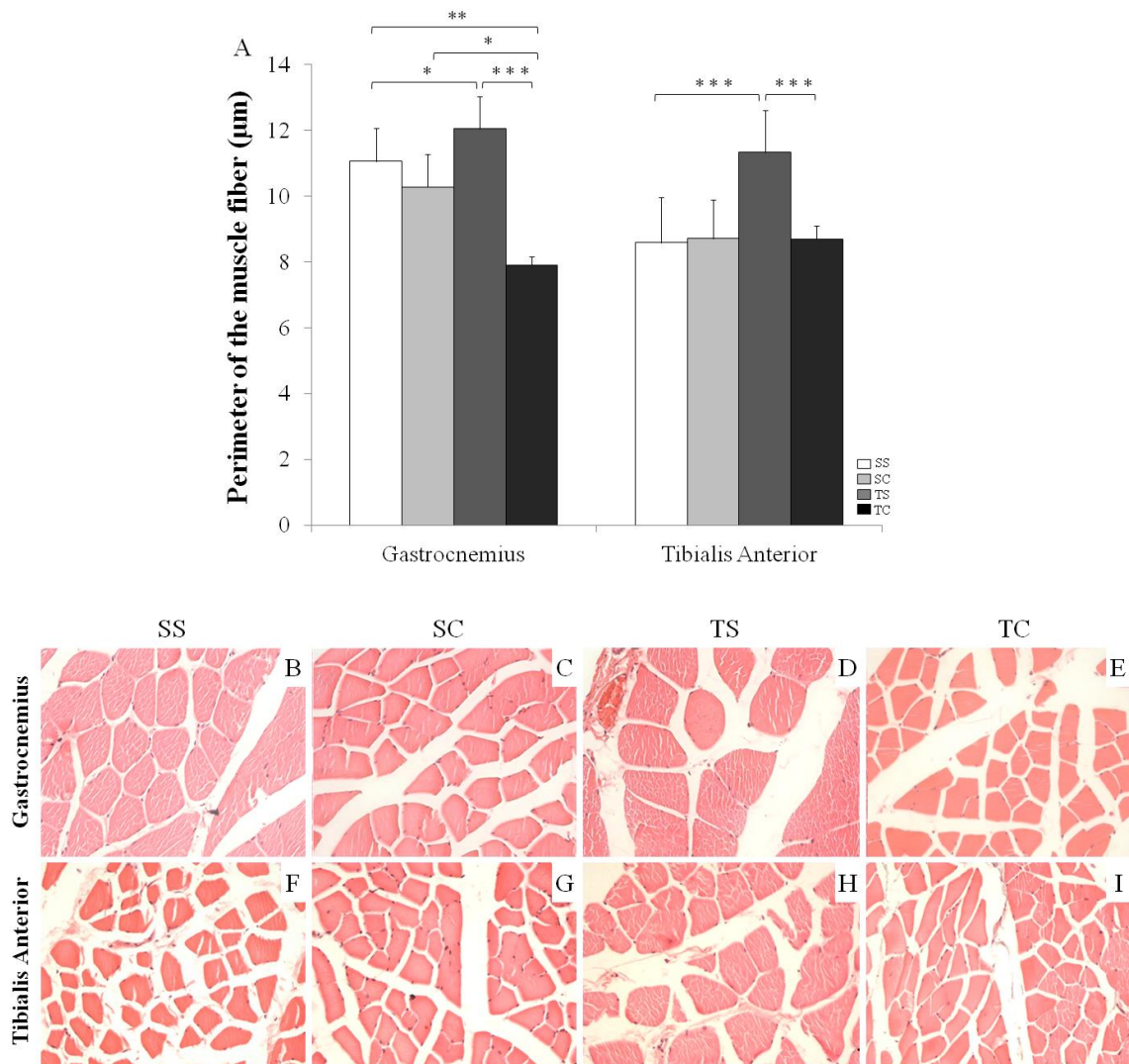


Figura 2: Doença periodontal altera hipertrofia muscular. (E) A associação entre exercício físico e doença periodontal foi responsável por uma diminuição significativa no perímetro das fibras do músculo gastrocnêmio. (I) Para o músculo tibial anterior a doença periodontal impediu a hipertrofia da fibra muscular no grupo treinado. Barras indicam desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,000$. Teste One-Way ANOVA e teste Post-Hoc de Tukey, com nível de significância de 0,05%, $n=6$. SS: sedentários e sem doença periodontal, SC: sedentário e com doença periodontal, TS: treinado e sem doença periodontal, TC: treinado e com doença periodontal. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400X.

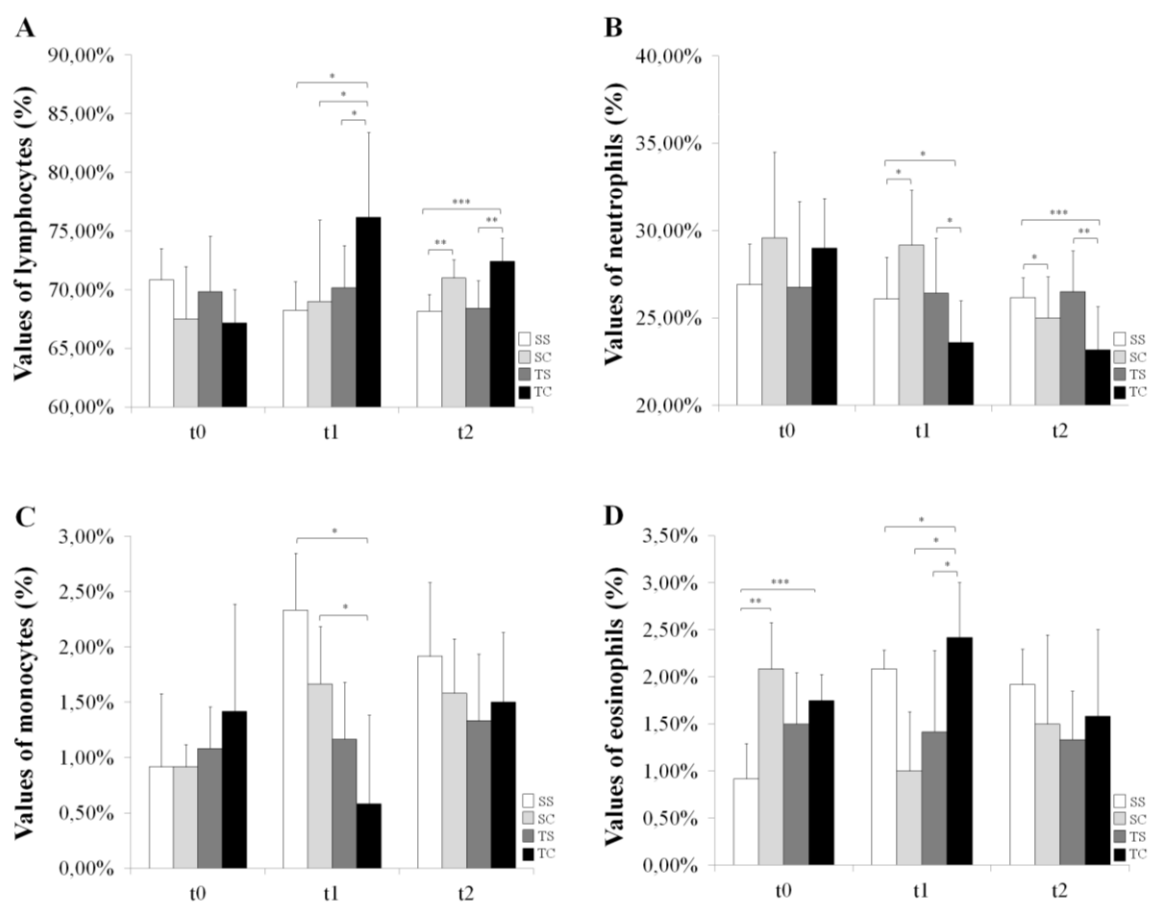


Figura 3: Alterações no leucograma desencadeadas pelo exercício físico e a doença periodontal. (A) Valores de linfócitos indicando que a indução de doença periodontal, tanto no grupo sedentário quanto no grupo treinado, esteve associada a um aumento significativo destas células. (B) A doença periodontal aumenta os níveis de neutrófilos circulantes e o exercício físico apresentou efeito atenuante; (C) Os níveis de monócitos apresentaram variação apenas no grupo com doença periodontal no início do estudo, reduzindo significativamente após 4 semanas, no grupo TC; (D) Os níveis de eosinófilos apresentam-se aumentados no início da doença periodontal e o exercício físico foi responsável por aumentar este efeito. Barras indicam desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,000$. Teste One-Way ANOVA e teste Post-Hoc de Tukey, com nível de significância de 0,05%, $n = 6$. SS: sedentários e sem doença periodontal, SC: sedentário e com doença periodontal, TS: treinado e sem doença periodontal, TC: treinado e com doença periodontal.

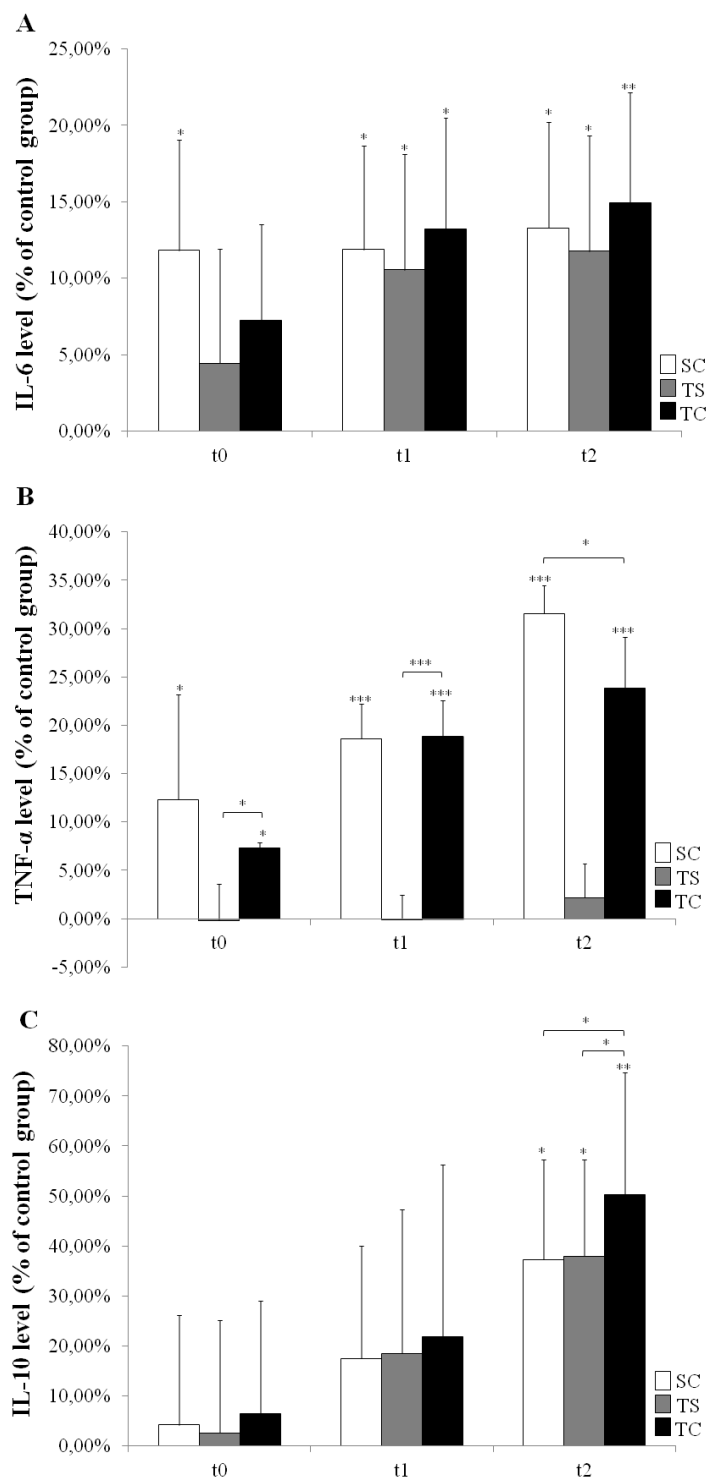


Figura 4: Doença periodontal altera os níveis séricos de interleucina. (A) Os animais com doença periodontal apresentaram níveis superiores de IL-6 em todos os momentos analisados, sendo que a associação da doença periodontal com o exercício físico apresentou efeito aditivo, após 8 semanas. (B) A doença periodontal foi responsável pelo aumento significativo de TNF- α . O exercício físico não apresentou efeito aditivo. (C) A indução da doença periodontal levou a um aumento significativo de IL-10, após 8 semanas. Barras indicam desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,000$. Ausência de colchetes indica diferença significativa em relação ao grupo controle. Teste One-Way ANOVA e teste Post-Hoc de Tukey, com nível de significância de 0,05%, $n = 6$. SS: sedentários e sem doença periodontal, SC: sedentário e com doença periodontal, TS: treinado e sem doença periodontal, TC: treinado e com doença periodontal.



Figura Suplementar: Sistema teste de linhas paralelas, para a determinação do perímetro médio das fibras musculares. A fórmula $b=\pi/2 \times d \times i$ foi utilizada para o cálculo do perímetro, onde b corresponde ao perímetro, d corresponde à distância entre as linhas e i corresponde ao número de intersecções entre as fibras e as linhas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400X.

SEGUNDO ARTIGO

A ser submetido ao periódico *Mediators of Inflammation*, fator de impacto 3,882 (2012).

O artigo está configurado de acordo com as normas do periódico.

INFLUÊNCIA DA DOENÇA PERIODONTAL ASSOCIADA AO EXERCÍCIO FÍSICO NOS NÍVEIS SÉRICOS DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E NO PROCESSO DE REPARO MUSCULAR

Bárbara Capitanio de Souza¹, Marcelo Ekman Ribas¹, André Luiz Lopes², Bruno Costa Teixeira², Marcelo Lazzaron Lamers¹

1-Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

2-Laboratório de Pesquisa do Exercício (LAPEX) da Escola de Educação Física (ESEF) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

Autor para correspondência:

Marcelo Lazzaron Lamers

Endereço: Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2492, sala 503, CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, Telefone +55 51 33085011; Fax +55 51 33085003, email marcelo.lamers@ufrgs.br.

Resumo

Objetivo: Analisar o impacto da doença periodontal (DP) associada ao exercício físico sobre mediadores inflamatórios e reparo muscular. *Materiais e métodos:* 24 ratos wistar foram divididos em 4 grupos experimentais: Controle saudável e sedentário (SS); Controle saudável e treinado (TS); DP e sedentário (SC) e DP e treinado (TC). Foi realizada indução de DP nos grupos SC e TC. Os animais realizaram exercício físico em esteira, durante 8 semanas. Foram realizadas coletas de sangue para a análise de IL-6, IL-10, TNF- α e leucograma. Foi induzida criolesão nos músculos tibial anterior e gastrocnêmio para posterior análise morfológica. *Resultados:* A DP foi capaz de modificar a contagem de leucócitos com o exercício físico apresentando um papel aditivo. A DP aumento os níveis de IL-6, IL-10 e TNF- α , sendo que o exercício físico modificou apenas os valores de IL-10. A associação entre exercício físico e DP foi responsável por uma maior intensidade inflamatória na região de indução da lesão. *Conclusão:* A DP modificou os níveis séricos de marcadores inflamatórios e, quando associada ao exercício físico, influenciou negativamente no processo de reparo muscular.

Palavras-chave: Interleucinas, leucócitos, tibial, gastrocnêmio.

Abstract

Objective: To analyze the impact of periodontal disease (PD) associated with physical exercise on inflammatory mediators and muscle repair. *Methods:* 24 Wistar rats were divided into 4 groups: healthy sedentary (SS), healthy trained (TS), sedentary with PD (SC) and trained with PD (CT). PD was induced in groups SC and TC while the trained group performed treadmill exercise for 8 weeks. Blood samples were collected for analysis of IL-6, IL-10, TNF- α and white blood count. Cryoinjury was induced in the tibialis anterior and gastrocnemius, which were submitted to morphological analysis. *Results:* The DP was able to modify the leukocyte counts with exercise showing an additive role. DP increased levels of IL-6, IL-10 and TNF- α , and physical exercise only the changed values of IL-10. The association between physical exercise and PD was responsible for an increased intensity in the region of inflammatory lesion induction. *Conclusion:* The inflammatory markers serum levels modified by PD, when combined with exercise, will negatively influence the process of muscle repair.

Key words: Interleukins, leukocytes, tibialis, gastrocnemius.

1. Introdução

As doenças periodontais são doenças infecto-inflamatórias destrutivas dos tecidos moles e duros que circundam os dentes [1]. São causadas por bactérias orais, que afetam os tecidos de proteção (gingivites) e de sustentação dos dentes (periodontites) [2, 3]. Esta patologia é capaz de modificar diferentes mediadores inflamatórios com consequentes repercussões sistêmicas [4]. Dentre estes mediadores podemos citar as citocinas, que são substâncias secretadas por células de defesa e servem para ativar ou modular aspectos específicos da inflamação. A maioria destes compostos são pró-inflamatórios, ou seja, eles promovem ou retroalimentam o processo inflamatório [4, 5], sendo que o perfil de secreção de citocinas pode ser considerado como um indicador de risco da periodontite [5].

O processo de reparo tecidual envolve a ação sincronizada de elementos celulares (leucócitos) e químicos (citocinas) que são recrutados para as áreas de lesão com a finalidade de restaurar a homeostase dos tecidos e reestabelecer a sua estrutura [6, 7]. Ele representa uma resposta do organismo a qualquer dano aos tecidos, provocado por uma grande variedade de estímulos químicos e/ou mecânicos [8]. Perturbações deste processo podem comprometer a eficiência da resposta inflamatória e consequentemente gerar um reparo tecidual deficiente [9].

O aumento do estresse químico ou mecânico imposto à musculatura induz ao dano deste tecido, que pode ocorrer em diferentes magnitudes, dependendo do tipo e da carga do exercício realizado [10, 11]. Exercícios excêntricos com intensidades moderadas já podem causar dano muscular, afetando a estrutura e o desempenho muscular [11]. Algumas substâncias, que têm sua expressão estimulada pelo exercício físico, como mediadores inflamatórios e radicais livres, quando presentes em elevadas concentrações, podem induzir alterações severas na estrutura de moléculas fundamentais para a manutenção da homeostasia celular, resultando numa possível perda de funcionalidade ou da vitalidade das células do tecido envolvido [12].

É possível que alterações nos níveis séricos de marcadores inflamatórios desencadeados por diferentes situações inflamatórias influenciem indiretamente o funcionamento de músculos. O objetivo do estudo foi analisar o papel da associação entre doença periodontal e exercício físico sobre o reparo muscular.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização e Distribuição Amostral

O protocolo experimental segue as regras da Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei nº 11.794 (08.10.2008) e foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFRGS (nº 19728). Foram utilizados 24 ratos Wistar machos de 60 dias, pesando em média 250g e provenientes do biotério central da UFRGS. Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polipropileno (três animais em cada gaiola), recebendo ração balanceada para roedores e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo fotoperiódico de 12 horas claro/escuro. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, por meio de randomização estratificada para o peso, com 6 ratos em cada grupo: grupo 1) Controle saudável e sedentário (SS); grupo 2) Controle saudável e treinado (TS); grupo 3) Com doença periodontal e sedentário (SC) e grupo 4) Com doença periodontal e treinado (TC).

2.2. Indução de Doença Periodontal

A indução da doença periodontal foi realizada pela técnica da ligadura [13, 14]. Um operador devidamente treinado realizou o procedimento. Os animais foram sedados previamente à anestesia via IP com cloridrato de xilazina (1mg/kg) e foram anestesiados via IP com pentobarbital sódico (15mg/kg). Após a anestesia, foi acondicionado um fio de sutura de seda estéril 4.0 na região cervical dos segundos molares superiores e dos primeiros molares inferiores. Este procedimento foi realizado nos grupos SC e TC.

2.3. Protocolo de Exercício Físico e Criolesão

O protocolo de exercício teve início a partir do trigésimo dia após a colocação das ligaduras e teve a duração de cinco dias por semana, durante oito semanas. A atividade física de escolha foi a corrida em esteira rolante. O protocolo de exercícios foi adaptado do protocolo de estudo para verificação do limiar anaeróbio de ratos, e consistiu de exercícios físicos diários, com aumento gradual das velocidades até alcançar aproximadamente 70% da capacidade de velocidade do animal. A disposição da duração do exercício assim como a velocidade foi adaptada do estudo correspondente [15] e estão indicadas na tabela 1. Os animais foram pesados, ao longo das semanas de treinamento.

Após o término do período de protocolo de exercício, os animais foram submetidos a

uma lesão muscular pela técnica da criolesão [16]. Para isso, os animais foram sedados com cloridrato de xilazina (1mg/kg) e anestesiados com pentobarbital sódico (15mg/kg). Um operador devidamente treinado realizou o procedimento. Para a indução da criolesão, foi utilizado um bastão metálico, com 6 mm de diâmetro, previamente imerso em nitrogênio líquido (20s). O bastão foi pressionado diretamente contra o músculo de uma das patas do animal, durante 10 segundos. Após um novo resfriamento do bastão, este procedimento foi repetido sobre o mesmo músculo. A pata homóloga serviu como controle. Para evitar desconforto após a indução da criolesão, foi administrado paracetamol (110-300mg/kg/dia). Após a criolesão, os animais não realizaram qualquer protocolo de exercício e, ao término dos três dias, foram sacrificados.

2.4. Coleta de Sangue

Foram realizadas duas coletas de sangue da veia caudal em diferentes momentos: Ao final da oitava semana do protocolo de exercício e 3 dias após a criolesão [17]. As amostras de sangue (1ml) foram centrifugadas (4°C, 3.200 xg, 10min), sendo o soro conservado a -80°C até o momento da análise. A quantificação dos marcadores inflamatórios (IL-6, IL-10 e TNF- α) no soro, foi realizada pelo método ELISA (Enzyme - linked immunosorbent assay) (BD Biosciense, San Diego, CA). A análise de sangue foi realizada por alteração de absorvância no comprimento de onda 450nm, com correção para 560nm, utilizando um leitor de ELISA (xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer Bio-Rad Hercules, CA).

Durante a coleta de sangue, foram realizadas lâminas de esfregaço sanguíneo, onde as lâminas foram secas e coradas com corante hematológico Panótico (RENYLAB QUIM. FARM. LTDA, Barbacena – MG). A contagem de leucócitos, em valores relativos (%) foi realizada por um único observador cego e calibrado antes e durante o estudo (Kappa interexaminador - 0,8 e intraexaminador – 0,882) . A técnica de análise utilizada foi o Método de Schilling [18, 19]. As análises foram realizadas com microscópio binocular Olympus Optical Co., modelo CH30RF100, no aumento de 400x.

2.5. Obtenção das Amostras

Os animais foram sacrificados, e os músculos Tibial e Gastrocnêmio foram coletados, fixados em solução de methacarn (metanol 60%, ácido acético 10% e clorofórmio 30%, 4 h, 4°C), desidratados, diafanizados e incluídos em parafina (Paraplast[®] Oxford, St. Louis, Mo., USA). Cortes de 5 μ m foram obtidos em micrótomo e submetidos a coloração por hematoxilina e eosina (HE), seguido de desidratação, diafanização e montagem em resina.

2.6. Análise Morfométrica do Timo

Após o processamento e inclusão das peças, foram realizadas cortes com 5µm de espessura. Para análise morfométrica, foram selecionados aleatoriamente três cortes de cada estrutura e, em cada corte, foram escolhidas cinco áreas de leitura. As imagens foram capturadas por um sistema de câmera de vídeo JVC modelo TK-C620 (1 CCD, Victor Co., Tokyo, Japão) acoplada a um microscópio binocular Olympus Optical Co., modelo CH30RF100, no aumento de 200x. As imagens foram registradas utilizando o software Microsoft VidCap 32 (Microsoft Corp. – USA. Foi utilizada como critério de análise da alteração ou da degeneração tímica, a substituição do parênquima tímico por tecido adiposo. Para isso, a densidade volumétrica das células adiposas foi quantificada utilizando um sistema teste (M-42) (Figura Suplementar 1A) sobre as imagens capturadas. A densidade volumétrica corresponde à concentração relativa da estrutura ou tecido de estudo. A fórmula $V = Pp/Pt \times 100\%$ foi utilizada para o cálculo da densidade volumétrica de tecido adiposo presente no parênquima tímico, onde Pp corresponde ao número de pontos sobre células adiposas e Pt o número de pontos do sistema teste (42, neste caso). O resultado final corresponde à média de densidade volumétrica das cinco áreas analisadas [20, 21, 22, 23].

2.7. Análise da Intensidade Inflamatória no Músculo Lesionado

Após o processamento e inclusão das peças, foram realizadas cortes com 5µm de espessura. Para análise da intensidade inflamatória, foram selecionados aleatoriamente três cortes de cada estrutura e, em cada corte, foram escolhidas três áreas de leitura (centro de lesão, região intermediária e área livre da lesão). As imagens foram capturadas por um sistema de câmera, no aumento de 400x. Em cada área de leitura, foram realizadas três análises da densidade volumétrica da intensidade inflamatória, utilizando um sistema teste M-42 (Figura Suplementar 2). A fórmula $V = Pp/Pt \times 100\%$ foi utilizada para o cálculo da densidade volumétrica das células inflamatórias. O resultado final corresponde à média de densidade volumétrica das análises, em cada área de leitura [20, 21, 22, 23].

2.8. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 17.0 para *Windows*. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão e porcentagem. Para realizar a comparação das médias entre os grupos, nos diferentes momentos analisados, foi utilizando o teste One-Way ANOVA e teste Post-Hoc de Tukey, com nível de significância de 0,05%.

3. Resultados

3.1. Leucograma

O modelo de treinamento físico utilizado, por si só, não alterou nenhum dos valores do leucograma quando comparado os animais treinados com os sedentários. Antes da criolesão, os animais do grupo com doença periodontal apresentaram, em média, um aumento no nível de leucócitos circulantes, quando comparados ao grupo controle (Figura 1A e B), o que indicaria uma resposta inflamatória alterada nestes animais. Após três dias da indução da lesão, observou-se que os animais treinados e com doença periodontal apresentavam os valores referentes a neutrófilos elevados em relação aos demais grupos, sugerindo uma resposta inflamatória aguda mais prolongada. Estes dados são reforçados pelos valores de monócitos encontrados (Figura 1C), onde pode ser observados maiores valores deste tipo celular nos grupos sem doença periodontal. Adicionalmente, constatou-se que a associação do exercício físico com a doença periodontal aumentou os níveis de eosinófilos circulantes. Estes dados sugerem um efeito da indução da doença periodontal sobre o recrutamento de células mielóides. Os valores relativos para basófilos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (dados não mostrados). A análise histomorfométrica dos timo não indicou diferença entre os grupos analisadas, quando avaliada a substituição do parênquima tímico por tecido adiposo (Figura suplementar 1B).

3.2. Citocinas e Intensidade Inflamatória Muscular

A análise dos níveis plasmáticos de citocinas demonstrou que antes da lesão, o exercício físico causou aumento apenas nos níveis de interleucinas anti-inflamatórias como a IL-10. Já a doença periodontal induziu um aumento nos níveis de IL-10 e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 (Figura 2). Estes dados sugerem que a doença periodontal é capaz de induzir uma reação pró-inflamatória. Após três dias da criolesão, todos os grupos experimentais apresentaram diminuição na variação dos níveis das citocinas analisadas quando comparado ao grupo sedentário, embora os grupos com doença periodontal ainda apresentassem níveis superiores de IL-6 e TNF- α . A associação do exercício físico e da doença periodontal manteve os níveis de citocina anti-inflamatória IL-10 elevados.

A análise da intensidade inflamatória do músculo tibial anterior e gastrocnêmio (Figura 3 e 4, respectivamente), após 3 dias da indução de criolesão, indica que a região central da lesão dos animais sedentários e treinados sem doença periodontal, apresentavam

níveis semelhantes de células inflamatórias. O grupo sedentário com doença periodontal apresentou aumento tanto na região intermediária quanto central da lesão. O grupo em que ocorreu a associação entre a doença periodontal e o exercício físico foi o que apresentou alterações mais significativas no número de células inflamatórias tanto na região central quanto na região intermediária da lesão.

4. Discussão

Diferentes infecções crônicas podem modular o grau de resposta imunológica sistêmica, através da regulação do perfil de leucócitos circulantes e dos níveis séricos de interleucinas, o que pode influenciar diferentes processos de regeneração/reparo [24, 25]. Neste estudo, demonstramos que a doença periodontal induz um aumento da resposta pró-inflamatória de ratos sedentários e treinados, a qual foi correlacionada com alterações no processo de reparo de músculos estriados lesionados por criolesão, sendo que este efeito, foi exacerbado pela prática moderada de exercício físico em esteira.

A prática de exercício físico pode desencadear diferentes níveis de lesões musculares e o processo de reparo muscular envolve a ativação de células satélites, as quais são células precursoras miogênicas [25]. Já foi demonstrado que a ativação destas células pode ser influenciada pelos níveis locais ou sistêmicos de mediadores inflamatórios como IL-6 [26, 27, 28]. A prática moderada de exercício físico pode causar um aumento do perfil anti-inflamatório, além de regular os níveis de cortisol circulantes [29], que permitem a correta ativação destas células.

Células miogênicas proliferam e diferenciam-se em miotubos multinucleados e, eventualmente, nas próprias miofibras. As interações entre as células inflamatórias e as células musculares esqueléticas podem influenciar a proliferação e diferenciação de células musculares e o reparo da lesão existente [25]. A reação inflamatória é um dos principais fatores que alteram o processo de reparo após lesão tecidual; por este motivo, a literatura indica que uma maneira eficaz de avaliar o reparo tecidual é estudar o processo inflamatório durante as fases de cicatrização [30].

Os dados encontrados através da análise do leucograma indicam que houve um recrutamento expressivo de leucócitos, no período após lesão. Para os animais do grupo treinado com doença periodontal, foi observada uma diferença significativa no aumento do número de neutrófilos. Alguns trabalhos mostram que os neutrófilos podem desempenhar um

papel chave na reparação tecidual, devido seus danos secundários, por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases, bem como a facilitação da fagocitose e recrutamento de monócitos, pela liberação de citocinas [30, 31, 32]. Apesar dos leucócitos serem células fundamentais para o adequado reparo tecidual, através da secreção de fatores de crescimento e citocinas que coordenam a miogênese [33], a desregulação da expressão das citocinas inflamatórias, decorrentes de um maior recrutamento destas células ou da permanência prolongada na região de lesão, pode levar à um processo de reparo deficiente [34].

A leitura do leucograma também indicou um aumento significativo de eosinófilos para o grupo treinado com doença periodontal. O ambiente inflamatório também aumenta a ativação de eosinófilos, que contribuem para a lise muscular e para o aumento de linfócitos através da produção de proteína básica principal-1 (*major basic protein-1*, MBP-1). Os eosinófilos também podem aumentar a fibrose muscular através de processos MBP-dependentes e regulam negativamente a resposta imune celular ao músculo lesionado [25]. Adicionalmente, os valores de monócitos – células precursoras de macrófagos – encontram-se reduzidos, para os grupos de animais com doença periodontal, em relação aos demais grupos, e aumentados para o grupo de animais treinados e sem doença, após a indução de lesão muscular. Estas células têm papel importante no reparo muscular, pois originam diferentes linhagens de macrófagos, responsáveis por promoverem a diferenciação e proliferação de células satélites [32, 35]. Este fato sugere que a doença periodontal estaria retardando o processo de reparo muscular.

Os resultados das análises das células mielóides corroboram com os resultados encontrados na análise histomorfológica das áreas onde foi realizada a indução da lesão muscular. Tanto no músculo gastrocnêmio, como no tibial anterior a intensidade inflamatória quantificada indica que os grupos com doença periodontal apresentaram uma maior quantidade de células inflamatórias, nas três áreas analisadas. Além disso, a associação da doença periodontal com o exercício físico apresentou efeito aditivo.

Os valores obtidos com as análises dos níveis séricos de mediadores inflamatórios indicam que a DP alterou os níveis de IL-6, TNF- α e IL-10, apresentando um efeito cumulativo, quando associada ao exercício físico, para IL-6 e IL-10. O aumento de citocinas como IL-6 e TNF- α , após a lesão muscular, indica que estas substâncias podem contribuir com o processo regenerativo. Contudo, a manutenção elevada de seus valores aumenta a produção de óxido nítrico (NO) e da síntese induzida de óxido nítrico (iNOS), substâncias tóxicas para o tecido [36]. A IL-10 caracteriza-se pela sua função anti-inflamatória nos

processos inflamatórios. Sua expressão pode ser aumentada, com o estímulo da intensidade inflamatória presente no processo e com o aumento da lesão celular, na finalidade de reduzir os danos secundários dos mesmos e estimular os estágios finais da resposta inflamatória [24]. A análise dos valores de IL-10 mostra que, no terceiro dia após a indução da lesão, o grupo de animais treinados e com doença periodontal apresentou valores significativamente maiores em relação aos demais. Isto sugere que a indução de doença periodontal teve um efeito adicional na resposta inflamatória, necessitando de um maior recrutamento de IL-10.

Diferentes infecções crônicas podem modular o grau de resposta imunológica sistêmica, através da regulação do perfil de leucócitos circulantes e dos níveis séricos de interleucinas, o que pode influenciar processos de regeneração/reparo em locais diferentes da infecção original [25]. Neste estudo, demonstramos pela primeira vez que a doença periodontal induz um aumento da resposta pró-inflamatória de ratos sedentários e treinados, a qual foi correlacionada com alterações no processo de reparo de músculos estriados lesionados por criolesão, sendo que este efeito, foi exacerbado pela prática moderada de exercício físico em esteira.

A prática de exercício físico pode desencadear diferentes níveis de lesões musculares, sendo que o processo de reparo muscular envolve a ativação de células satélites, as quais são células precursoras miogênicas [26]. Já foi demonstrado que a ativação destas células pode ser influenciada pelos níveis locais ou sistêmicos de mediadores inflamatórios como IL-6 e TNF- α [30]. O exercício físico também pode causar um aumento do perfil anti-inflamatório, como a expressão de IL-10, além de regular os níveis de cortisol circulantes [24, 29], que permitem a correta ativação destas células. Os resultados obtidos com as análises dos níveis séricos de mediadores inflamatórios indicam que a doença periodontal alterou os níveis de IL-6, TNF- α e IL-10, apresentando um efeito aditivo, quando associada ao exercício físico, para IL-6 e IL-10. O aumento de citocinas como IL-6 e TNF- α , após a lesão muscular, indica que estas substâncias podem contribuir com o processo regenerativo, estimulando as células inflamatórias a iniciarem o processo de reparo tecidual [24]. Contudo, a manutenção elevada de seus valores aumenta a produção de óxido nítrico (NO) e da síntese induzida de óxido nítrico (iNOS), substâncias tóxicas para o tecido [25]. A IL-10 caracteriza-se pela sua função anti-inflamatória nos processos inflamatórios. Sua expressão pode ser aumentada, com o estímulo da intensidade inflamatória presente no processo e com o aumento da lesão celular, na finalidade de reduzir os danos secundários dos mesmos e estimular os estágios finais da resposta inflamatória [24]. A análise dos valores de IL-10 mostra que, no terceiro dia após a indução da lesão, o grupo de animais treinados e com doença periodontal apresentou valores

significativamente maiores em relação aos demais. Isto sugere que a indução de doença periodontal teve um efeito adicional na resposta inflamatória, necessitando de um maior recrutamento de IL-10.

As interações entre as células inflamatórias e as células musculares esqueléticas podem influenciar a proliferação e diferenciação de células musculares e o reparo da lesão existente [25]. Apesar dos leucócitos serem células fundamentais para o adequado reparo tecidual, através da secreção de fatores de crescimento e citocinas que coordenam a miogênese [17], a desregulação da expressão das citocinas inflamatórias, decorrentes de um maior recrutamento destas células ou da permanência prolongada na região de lesão, pode levar à um processo de reparo deficiente [34]. Neste estudo, tanto no músculo gastrocnêmio, como no tibial anterior a intensidade inflamatória quantificada indica que os grupos com doença periodontal apresentaram uma maior quantidade de células inflamatórias, nas três áreas analisadas. Além disso, a associação da doença periodontal com o exercício físico apresentou efeito cumulativo.

A alteração no leucograma causada pela doença periodontal pode estar relacionada com a diminuição do reparo muscular. Observamos uma maior presença de neutrófilos circulantes, os quais desempenham um papel chave na reparação tecidual, devido seus danos secundários, por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases, bem como a facilitação da fagocitose e recrutamento de monócitos, pela liberação de citocinas [31, 32]. A associação entre doença periodontal e exercício físico também ocasionou um aumento nos níveis de eosinófilos circulantes. No ambiente de reparo muscular, estas células contribuem para a lise muscular e para o aumento de linfócitos através da produção de proteína básica principal-1 (*major basic protein-1*, MBP-1). Os eosinófilos também podem aumentar a fibrose muscular através de processos MBP-dependentes e regulam negativamente a resposta imune celular ao músculo lesionado [25]. Adicionalmente, os valores de monócitos – células precursoras de macrófagos – encontram-se reduzidos, para os grupos de animais com doença periodontal, em relação aos demais grupos, e aumentados para o grupo de animais treinados e sem doença, após a indução de lesão muscular. Estas células têm papel importante no reparo muscular, pois originam diferentes linhagens de macrófagos, responsáveis por promoverem a diferenciação e proliferação de células satélites [35]. Estes dados indicam que as alterações no leucograma causado pela doença periodontal estariam retardando o processo de reparo muscular.

5. Conclusão

As células mielóides e os marcadores inflamatórios possuem um importante papel no processo de reparo muscular. A doença periodontal induzida foi capaz de modificar estes fatores de modulação inflamatória e quando associada ao exercício físico influenciou negativamente no processo de reparo muscular.

Referências

1. H. Loe, E. Theilade, S. B. Jensen. “Experimental Gingivitis in Man”. *J Periodontol*, vol. 36, pp. 177-87, 1965.
2. U. M. Irfan, D. V. Dawson, N. Bissada. “Epidemiology of periodontal disease: a review and clinical perspectives”. *J Int Acad Periodontol*, vol. 3, no. 1, pp. 14-21, 2001.
3. R. P. Teles, V. Likhari, S. S. Socransky et al. “Salivary Cytokine Levels in Chronic Periodontitis and Periodontally Healthy Subjects. A cross-sectional Study”. *J Periodontal Res*, vol. 44, no. 3, pp. 411-417, 2009.
4. J. A. Keelan, P. M. Wong, P. S. Bird et al. “Innate inflammatory responses of human decidua cells to periodontopathic bacteria”. *Am J Obstet Gynecol*, vol. 202, no. 5, pp. 1-11, 2010.
5. S. A. Eming, M. Hammerschmidt, T. Krieg et al. “Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration”. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 20, no. 5, pp. 517-27, 2009.
6. O. Soehnlein, L. Lindbom, “Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation”. *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, no. 6, pp. 427-439, 2010.
7. C. Malm. “Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction?”. *Acta Physiol Scand*, vol. 171, no. 3, pp. 233-9, 2001.
8. J. G. Tidball. “Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation”. *J Appl Physiol*, vol. 98, no. 5, pp. 1900-8, 2005.
9. P. M. Clarkson, M. J. Hubal. “Exercise-induced Muscle Damage in Humans”. *Am J Phys Rehabil*, vol. 81, pp. S52-S69, 2002.
10. R. L. Lieber, S. Shah, J. Fridén. “Cytoskeletal disruption after eccentric contraction-induced muscle injury”. *Clin Orthop*, vol. 403, pp. S90-S99, 2002.

11. V. Paschalis, Y. Koutedakis, A. Z. Jamurtas et al. "Equal volumes of high and low intensity of eccentric exercise in relation to muscle damage and performance". *J Strength Cond Res*, vol. 19, pp. 121–5, 2005.
12. J. Lee, N. Koo, D. B. Min. "Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals". *Compre Rev Food Sci Food Safety*, vol. 3, pp. 21-33, 2004.
13. S. Kimura, A. Nagai, T. Onitsuka et al. "Induction of experimental periodontitis in mice with Porphyromonas gingivalis-adhered ligatures". *J Periodontol*, vol. 71, no. 7, pp.1167-73, 2000.
14. E. J. Bak, H. G. Park, M. Kim et al. "The effect of metformin on alveolar bone in ligature-induced periodontitis in rats: a pilot study". *J Periodontol*, vol. 81, no. 3, pp. 412-19, 2010.
15. M. B. de Araújo, F. B. M. Gobatto, F. A. Voltarelli et al. "Running training effects in different intensities on the aerobic capacity and lactate production by the muscle of wistar rats". *Rev Bras Med Esporte*, vol. 15, no. 5, pp. 365-69, 2009.
16. E. H. Miyabara et al. "Expression of tropism-related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A". *Cell Tissue Res*, vol.319, no. 3, pp. 479-89, 2005.
17. J. G. Tidball, H. M. Wehling. "Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice *in vivo*". *J Physiol*, vol. 578, no. Pt 1, pp. 327-36, 2007.
18. G. Gulati, J. Song, A. D. Florea et al. "Purpose and criteria for blood smear scan, blood smear examination, and blood smear review". *Ann Lab Med*, vol.33, no. 1, pp. 1-7, 2013.
19. Ghermati, A. Corbin, L. Chabanne et al. "Canine large granular lymphocyte leukemia and its derived cell line produce infectious retroviral particles". *Vet Pathol*, vol. 37, no. 4, pp. 310-7, 2000.
20. C. N. Battlehner, E. G. Caldini, J. C. Pereira. "How to measure the increase in elastic system fibres in the lamina propria of the uterine cervix of pregnant rats". *J Anat.* vol. 203, pp. 405–18, 2003.
21. V. Morath, M. Keuper, M. Rodriguez-Franco et al. "Semi-automatic determination of cell surface areas used in systems biology". *Front Biosci*, no. 5, pp. 533-45, 2013.
22. C. N. Battlehner, E. G. Caldini, J. C. Pereira. "How to measure the increase in elastic system fibres in the lamina propria of the uterine cervix of pregnant rats. *J Anat.* vol. 203, pp. 405–18, 2003.
23. M. T. Howes, M. Kirkham, J. Riches et al. "Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells". *JCB*, vol. 190, no. 4, pp. 675-91, 2010.

24. S. A. Villalta, C. Rinaldi, B. Deng et al. "Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype". *Hum Mol Genet*, vol. 20, no. 4, pp. 790-805, 2011.
25. J. G. Tidball, S. A. Villalta. "Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 298, no. 5, pp. 1173-87, 2010.
26. I. H. K. Dias, I. L. C. Chapple, M. Milward et al. "Suloraphane restores cellular glutathione levels and reduces chronic periodontitis neutrophils hyperactivity *in vitro*". *PloS One*, vol. 8, no. 6, pp. e66407, 2013.
27. L. C. Chapple, J. B. Matthews. "The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction". *Periodontol 2000*, vol.43, pp. 160-232, 2007.
28. J. B. Matthews, H. J. Wright, A. Roberts et al. "Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis". *Clin Exp Immunol*, vol. 147, pp. 255-64, 2007.
29. E. E. Hill, E. Zack, C. Battaglini et al. Exercise and circulating cortisol levels: the intensity threshold effect". *J Endocrinol Invest*, vol. 31, no. 7, pp. 587-91, 2008.
30. N. C. Lockhart, S. V. Brooks. "Neutrophil accumulation following passive stretches contributes to adaptations that reduce contraction-induced skeletal muscle injury in mice," *Journal of Applied Physiology*, vol. 104, no. 4, pp. 1109–1115, 2008.
31. F. X. Pizza, J. M. Peterson, J. H. Baas et al. "Neutrophils contribute to muscle injury and impair its resolution after lengthening contractions in mice". *Journal of Physiology*, vol. 562, no. 3, pp. 899–913, 2005.
32. S. Gordon, P. R. Taylor. "Monocyte and macrophage heterogeneity". *Nat Rev Immunol*, vol. 5, pp. 953 - 64 , 2005 .
33. J. Lagrota-Candido, I. Canella, D. F. Pinheiro et al. "Characteristic pattern of skeletal muscle remodelling in different mouse strains," *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 91, no. 6, pp. 522–29, 2010.
34. E. Perdiguero, Y. Kharraz, A. L. Serrano, and P. Munoz-Canoves, "MKP-1 coordinates ordered macrophage-phenotype transitions essential for stem cell-dependent tissue repair," *Cell Cycle*, vol. 11, no. 5, pp. 877–86, 2012.
35. M. Cantini, E. Giurisato, C. Radu et al. "Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts *in vitro* and *in vivo*". *Neurol Sci*, vol. 23, pp. 189-194, 2002.
36. L. Arnold, A. Henry, F. Poron et al. "Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis". *J Exp Med*, vol. 204, pp. 1057-1069 , 2007 .

Tabela 1: Protocolo de exercício. Os animais foram submetidos a treinamentos diários com aumento gradual na intensidade e no tempo de realização.

Semana	Velocidade (m/min)	Tempo (min)
1º	5	20
2º	10	20
3º	10	30
4º	15	30
5º	15	30
6º	20	40
7º	20	40
8º	25	40

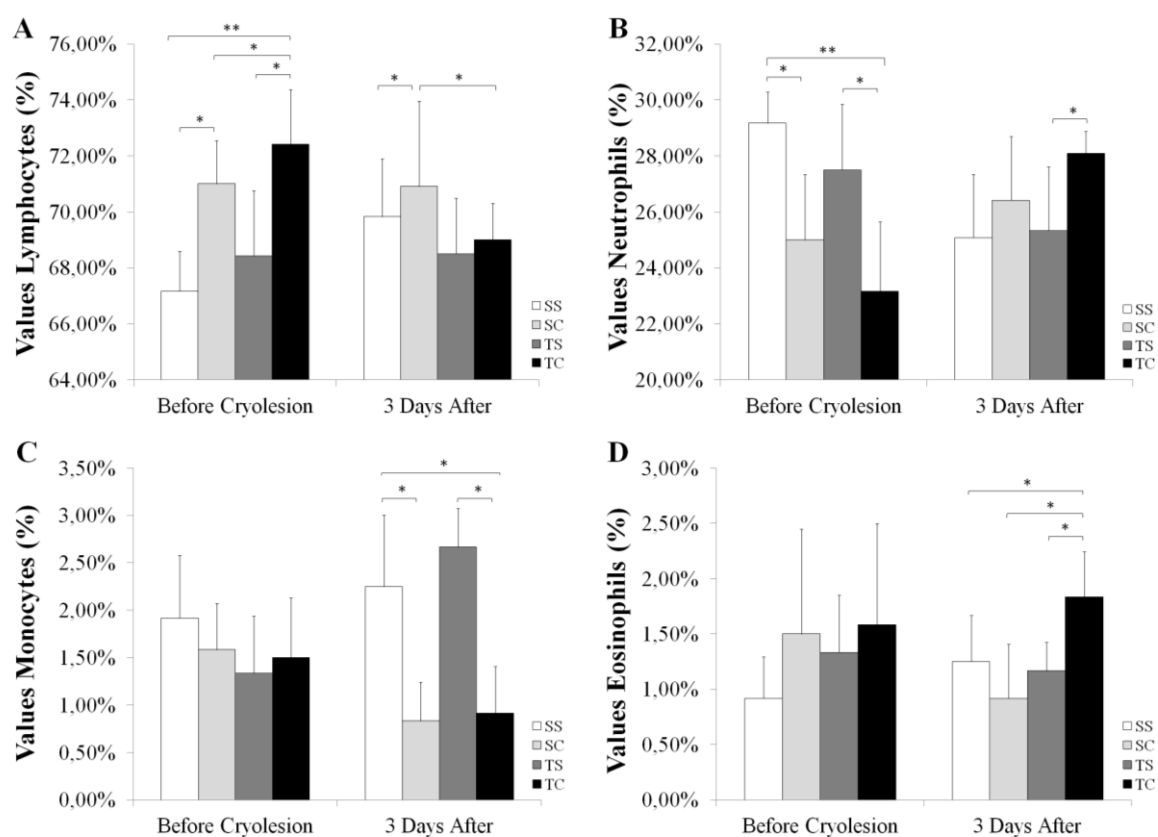


Figura 1: Alterações no leucograma desencadeadas pelo exercício físico e pela doença periodontal. (A) e (B) Doença periodontal foi responsável pelos aumentos de linfócitos e neutrófilos e (C) redução dos níveis de monócitos. (D) Exercício físico associado à doença periodontal resultou em maiores níveis de eosinófilos. Barras indicam desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Teste One-Way ANOVA e teste Post-Hoc de Tukey, com nível de significância de 0,05%, $n=6$. SS: sedentários e sem doença periodontal, SC: sedentário e com doença periodontal, TS: treinado e sem doença periodontal, TC: treinado e com doença periodontal.

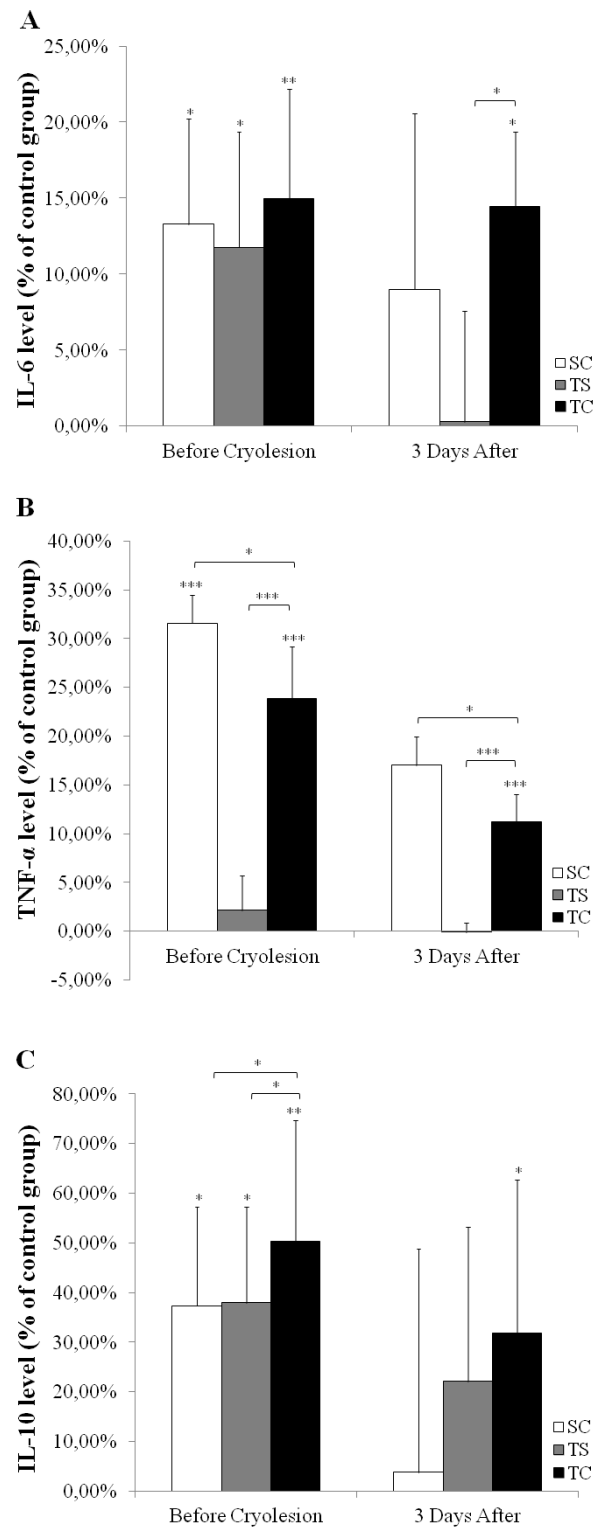


Figura 2: Doença periodontal altera os níveis séricos de interleucina. (A) e (B) Doença periodontal foi responsável por um aumento das citocinas pró-inflamatórias. (C) Exercício físico associado à doença periodontal resultou em um maior recrutamento de IL-10. Barras indicam desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,000$. Ausência de colchetes indica diferença significativa em relação ao grupo controle. Teste One-Way ANOVA e teste Post-Hoc de Tukey, com nível de significância de 0,05%, $n = 6$. SS: sedentários e sem doença periodontal, SC: sedentário e com doença periodontal, TS: treinado e sem doença periodontal, TC: treinado e com doença periodontal.

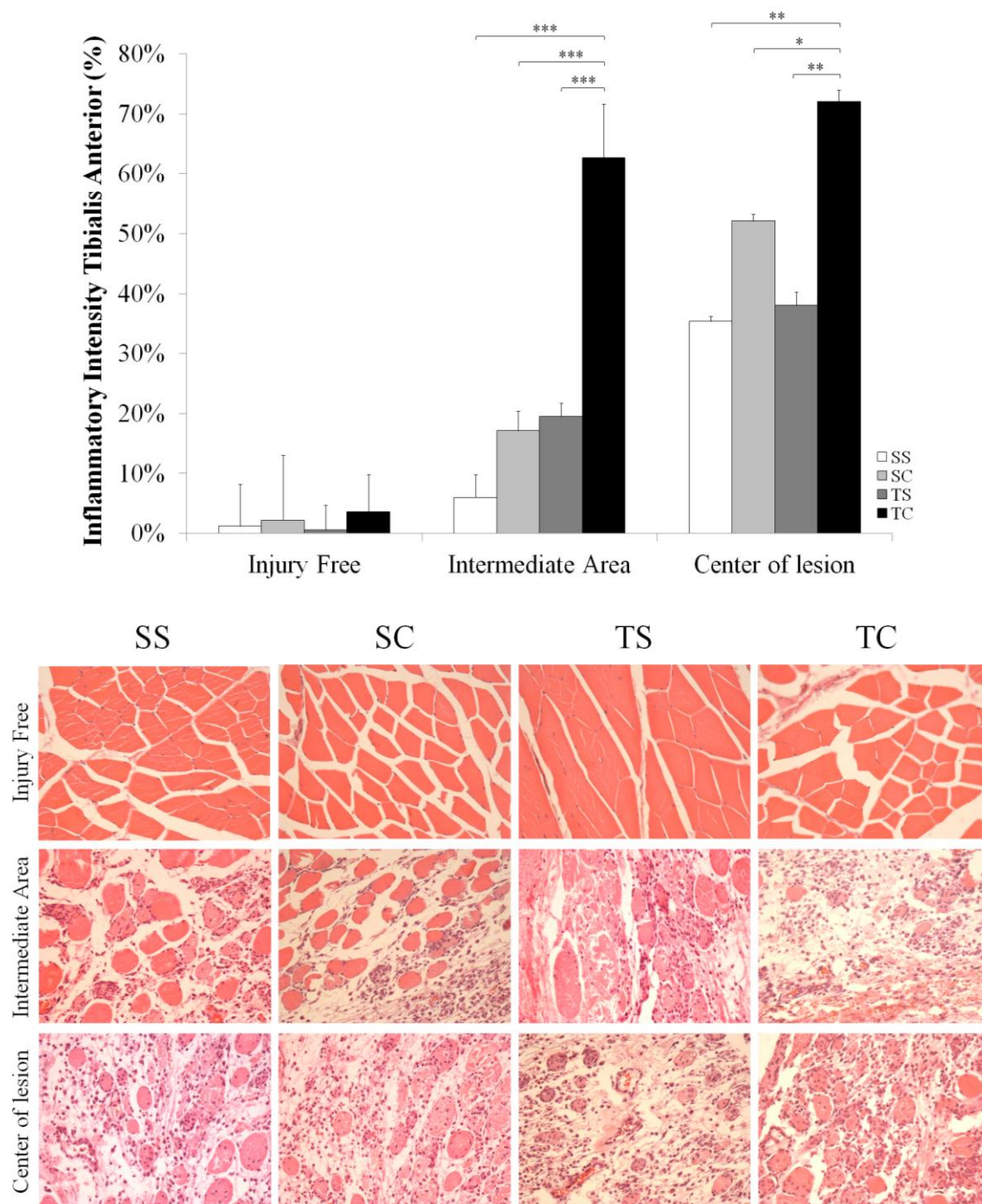


Figura 3: Doença periodontal altera a intensidade inflamatória. Exercício físico associado à doença periodontal teve um efeito aditivo na intensidade inflamatória. Barras indicam desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,000$. Ausência de colchetes indica diferença significativa em relação ao grupo controle. Teste One-Way ANOVA e teste Post-Hoc de Tukey, com nível de significância de 0,05%, $n=6$. SS: sedentários e sem doença periodontal, SC: sedentário e com doença periodontal, TS: treinado e sem doença periodontal, TC: treinado e com doença periodontal. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400X.

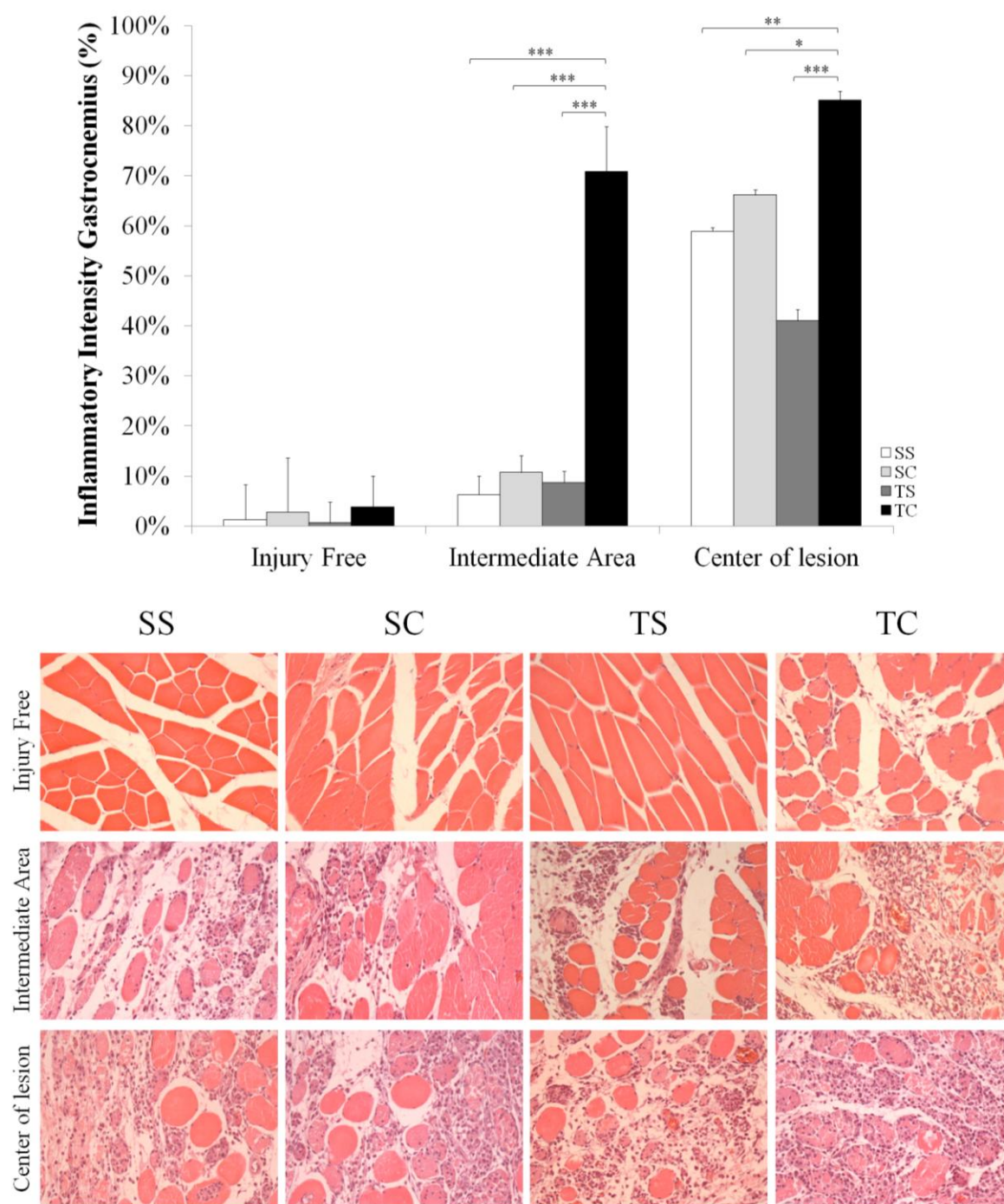


Figura 4: Doença periodontal altera a intensidade inflamatória. Exercício físico associado à doença periodontal teve um efeito aditivo na intensidade inflamatória. Barras indicam desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,000$. Ausência de colchetes indica diferença significativa em relação ao grupo controle. Teste One-Way ANOVA e teste Post-Hoc de Tukey, com nível de significância de 0,05%, $n = 6$. SS: sedentários e sem doença periodontal, SC: sedentário e com doença periodontal, TS: treinado e sem doença periodontal, TC: treinado e com doença periodontal. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400X.

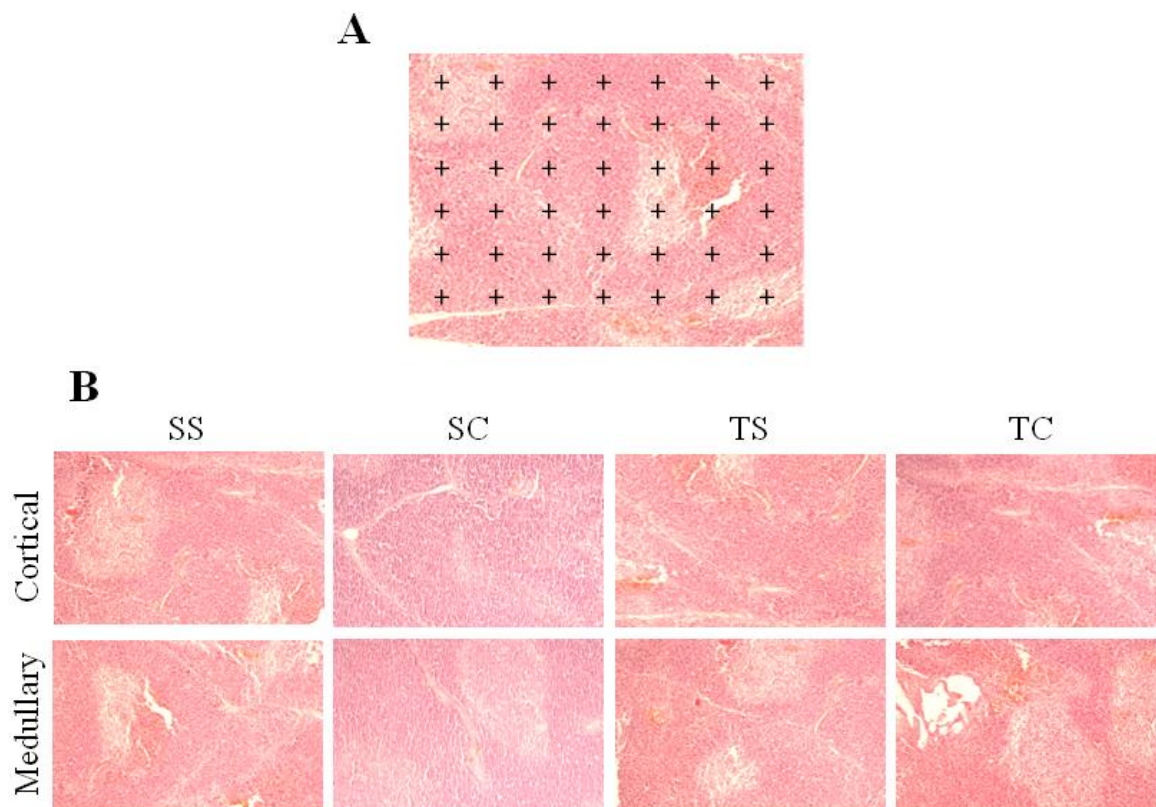


Figura Suplementar 1: Substituição do parênquima tímico por tecido adiposo. A fórmula $V = Pp/Pt \times 100\%$ foi utilizada para o cálculo da densidade volumétrica de tecido adiposo presente no parênquima tímico, onde Pp corresponde ao número de pontos sobre células adiposas e Pt o número de pontos do sistema teste (A). SS: sedentários e sem doença periodontal, SC: sedentário e com doença periodontal, TS: treinado e sem doença periodontal, TC: treinado e com doença periodontal. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 200X.

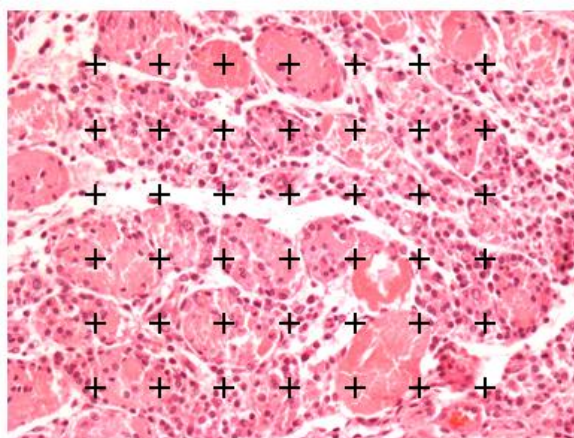


Figura Suplementar 2: Sistema teste para análise da intensidade inflamatória. A fórmula $V = Pp/Pt \times 100\%$ foi utilizada para o cálculo da densidade volumétrica das células inflamatórias, onde Pp corresponde ao número de pontos sobre células inflamatórias e Pt o número de pontos do sistema teste. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400X.

6 DISCUSSÃO

A doença periodontal possui uma multiplicidade de fatores capazes de estimular as células mielóides para produzirem mediadores inflamatórios (KINANE et al., 2005), gerando um quadro inflamatório que não se limita apenas aos tecidos periodontais. Apesar da natureza localizada da doença periodontal, algumas vias biológicas foram identificadas ligando a doença periodontal a uma resposta inflamatória sistêmica eficiente (AMAR et al., 2003; ELTER et al., 2006). Diferentes estudos epidemiológicos demonstram uma associação entre a doença periodontal com a progressão de outras condições, como por exemplo cardiopatias, câncer, diabetes, doença renal e doenças inflamatórias (EBERSOLE e CAPPELLI, 2000; NESSE et al., 2010; MARUYAMA et al., 2011; LOO et al., 2012; GOKHALE et al., 2013; ARIYAMUTHU, NOLPH e RINGDAHL, 2013), sendo uma possível correlação associada as modificações de fatores imunológico químicos e celulares. Até o momento, este é o primeiro trabalho a demonstrar a influência da doença periodontal sobre o metabolismo muscular de indivíduos sedentários ou treinados em condições fisiológicas e de reparo tecidual.

Neste estudo, demonstramos que o modelo empregado de indução de doença periodontal induz um aumento nos níveis de citocinas inflamatórias, bem como alterações no leucograma dos animais, sugerindo um perfil pró-inflamatório. Na patogênese da doença periodontal, é possível observar a migração de células inflamatórias (leucócitos) e o aumento local e sérico de mediadores inflamatórios como a Interleucina-6 (IL-6) e o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) (GARLET et al., 2004; NESSE et al., 2010). Do mesmo modo que estes fatores inflamatórios localmente estão envolvidos no processo de degradação da matriz extracelular e da reabsorção óssea, são responsáveis pela modificação da inflamação e de condições sistêmicas associadas (GRAVES E COCHRAN, 2003; GRAVES et al., 2008). É provável que os aspectos da patogênese da doença periodontal têm um potencial papel e impacto sobre a resposta inflamatória / imune sistêmica que inicia ou medeia uma ampla gama de patologias (AL-ZAHRANI et al., 2003; GENCO et al., 2005).

O exercício físico desencadeia uma resposta natural do organismo – estresse físico, que podem inferir em vários pontos da complexa sequência de eventos relacionada à resposta imune. Neste contexto, determinados fatores imunológicos (células e mediadores inflamatórios) vão responder diferentemente ao tipo e carga de exercício realizado (BERGUE et al., 2013). A atividade física também é capaz de induzir às mudanças na distribuição das

células do sistema imune. Estas células circulantes sofrem mudanças em seu número e capacidade funcional, pois são mediadas pela liberação de hormônios de estresse e citocinas, produzidos durante a atividade física (FINSTERER, 2012). O grau dessa mudança é diretamente proporcional à intensidade e à duração da atividade física. Exercício físico de maior intensidade estimula o aumento de mediadores inflamatórios, principalmente citocinas pró-inflamatórias, e em condições de suscetibilidade, pode contribuir para o agravamento de patologias associadas (PERVAIZ e HOFFMAN-GOETZ, 2012). Neste estudo, o modelo de exercício físico em esteira induziu aumento dos níveis séricos de IL-6, principalmente.

Em associação com o exercício físico intenso, a doença periodontal contribuiu para a modificação dos resultados do leucograma, bem como apresentou um efeito adicional sobre os níveis de citocinas inflamatórias. Do mesmo modo, este efeito pode ser observado sobre a atrofia muscular e sobre a resposta inflamatória celular, presente nas áreas de lesão induzida.

O tecido muscular constitui a maior massa celular e o maior componente proteico do organismo. Há uma relação direta da integridade morfofuncional da unidade motora com a saúde, estando essa suscetível às alterações da homeostase metabólica (TIMMERMAN e VOLPI, 2008). A redução do tamanho de fibras musculares é o resultado da combinação da atrofia de cada fibra muscular, influenciando diretamente na diminuição da massa muscular. A qualidade das fibras musculares influencia na gravidade da sarcopenia, visto que as fibras musculares do tipo I (aeróbicas, de contração lenta) parecem sofrer menos atrofia associada ao processo inflamatório, enquanto que a área relativa das fibras tipo II (anaeróbicas, de contração rápida) é mais suscetível (TIDBALL e VILLALTA, 2010; DENG et al., 2012). Neste estudo, demonstramos que animais treinados apresentaram aumento das fibras musculares, a qual foi bloqueada pela associação com a doença periodontal. Adicionalmente, foram observadas alterações no desempenho muscular induzidas pela doença periodontal, evidenciadas pelo aumento na curva de lactacidemia. Aparentemente, o músculo gastrocnêmio, cuja proporção de fibras é de aproximadamente 20% do tipo I e 80% do tipo 2, foi mais susceptível às alterações induzidas pela doença periodontal.

Uma das maiores causas do catabolismo muscular é a concentração aumentada de citocinas pró-inflamatórias, que provocam o aumento da apoptose nestes tipos de fibras musculares (PEDERSEN et al., 2003). Modificações nos fatores imunológicos podem ser responsáveis por perda de massa muscular, decorrente do aumento de substâncias pró-oxidantes e pró-inflamatórias, as quais possuem ações proteolíticas. Fatores anabólicos (insulina, testosterona, hormônio do crescimento – GH, IGF-1) podem ter sua ação e expressão modificadas por fatores catabólicos como o estresse oxidativo e citocinas pró-

inflamatórias (PARK, GOODPASTER e STROTMEYER, 2007; TIMMERMAN e VOLPI 2008). A testosterona e os androgênios, no tecido muscular, estimulam a síntese proteica e o recrutamento das células satélites. Por outro lado, a liberação destas substâncias pode ser inibida pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), estimulada pelas células mielóides (ROUBENOFF, 2003). Estas citocinas agem, principalmente, bloqueando os receptores de IGF-1 e impedindo que a via metabólica miogênica ocorra normalmente. Diferentes estudos já relataram que maiores concentrações de TNF- α e IL-6 inibem o efeito anabólico do IGF-1 no músculo, e que altas concentrações de IL-6 e baixas concentrações de IGF-1 contribuem sinergicamente para o agravamento da sarcopenia. De modo geral, independentemente dos mecanismos, a atrofia muscular ocorre quando o catabolismo ultrapassa a síntese proteica (PEDERSEN et al., 2003; NAYLOR e LEEUWENBURGH, 2008). É provável que a diminuição das fibras musculares detectadas neste estudo estejam relacionadas às alterações sistêmicas nos níveis de IL-6 e TNF- α induzidas pela DP.

As lesões musculares podem ser causadas por contusões, estiramentos ou lacerações. A força tênsil exercida sobre o músculo, durante o exercício físico, pode levar a um excessivo estiramento das miofibrilas e, conseqüentemente, a uma ruptura das mesmas. Três fases são identificadas neste processo: destruição, reparo e remodelação (TIDBALL e WEHLING, 2007). As duas últimas fases (reparo e remodelação) se sobrepõem e estão intimamente relacionadas. Após a fase de destruição, o reparo da lesão muscular começa com dois processos simultâneos e competitivos entre si: a regeneração da miofibrila e a formação do tecido conjuntivo cicatricial. Uma evolução balanceada destes processos é pré-requisito para uma ótima recuperação da função contrátil do músculo (DENG et al., 2012).

Após a lesão muscular, diferentes fatores imunológicos são recrutados para auxiliar no processo de reparo muscular. A resposta das células mielóides, na lesão muscular, promove a regeneração muscular e crescimento. Modificações neste processo podem ativar uma seqüência de interações entre células musculares e inflamatórias (TIDBALL e VILLALTA, 2010). A resposta inflamatória inicial é dominada por neutrófilos e posteriormente por macrófagos M1. Esta classe de macrófagos pode propagar a resposta neutrofílica pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e causar mais dano tecidual através da liberação de óxido nítrico. Células mielóides, no início da resposta inflamatória, podem estimular a fase proliferativa da miogênese, através de mecanismos mediados pelo TNF- α e IL-6; o prolongamento da presença destes fatores está associado com a transição para uma fase tardia de diferenciação no precece de miogênese (TIDBALL e WEHLING, 2007). Neste estudo, demonstramos que a doença periodontal induz alterações no leucograma, a qual foi associada

com uma maior presença de células inflamatórias no local da lesão muscular, sugerindo um retardo no processo de reparo muscular.

Os monócitos têm papel importante no reparo muscular, pois originam diferentes linhagens de macrófagos, responsáveis por promoverem a diferenciação e proliferação de células satélites miogênicas (PERDIGUERO et al., 2012). Nossos dados indicam que os animais com doença periodontal apresentaram valores reduzidos de monócitos, em relação ao grupo controle, sendo que a associação com o exercício físico resultou em um efeito aditivo na supressão destas células.

A fase de reparo na patofisiologia muscular está associada com a ação coordenada de macrófagos M1 e M2. Macrófagos M2 desempenham um papel importante na promoção do crescimento e regeneração. A sua ausência ou estímulo retardado pode prejudicar significativamente a diferenciação, o crescimento e o reparo muscular, após a lesão. Além disso, estas células atenuam nas populações de células mielóides presentes no início do processo inflamatório inibindo-as, através da liberação de citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10 (PERDIGUERO et al., 2012). A presença de macrófagos M2 na região de lesão está associada com a progressão da fase regenerativa muscular. As transições no fenótipo de macrófagos é um componente essencial da regeneração muscular, após lesão muscular. Este processo pode ser modificado pelo aumento dos fatores pró-inflamatórios, impedindo a sua evolução natural (CANTINI et al., 2002).

Os eosinófilos podem desempenhar um papel importante na resposta imunitária celular. O aumento da quantidade desta célula parece depender da presença e da funcionalidade linfócitos (WEHLING-HENRICKS, LEE e TIDBALL, 2004). Os eosinófilos são recrutados para os locais de inflamação por citocinas inflamatórias, que também estimulam sua diferenciação e ativação (WEHLING-HENRICKS et al., 2008). Neste estudo, os dados do leucograma indicam que houve um aumento coordenado de linfócitos e eosinófilos, principalmente em relação aos grupos de animais com doença periodontal induzida e que realizaram o exercício físico. Estes dados corroboram com outros estudos que associaram a presença de eosinófilos com patologias musculares (CAI et al., 2000). Estes resultados sugerem que a doença periodontal pode modificar mediadores inflamatórios e alterar indiretamente o metabolismo muscular.

7 CONCLUSÃO

- A doença periodontal não influenciou na variação do peso do animais.
- A análise da lactacidemia demonstrou que os animais treinados apresentavam um aumento na geração de lactato, o qual foi mais expressivo no grupo com doença periodontal.
- O modelo de treinamento físico utilizado não alterou significativamente os valores do leucograma. Contudo, a presença de doença periodontal foi responsável pelo maior recrutamento de células mielóides.
- A doença periodontal foi capaz de modificar os níveis de citocinas inflamatórias, sendo que a associação da mesma com o exercício físico apresentou efeito aditivo. O exercício físico, por si só, não alterou os níveis de mediadores inflamatórios.
- A indução da doença periodontal não alterou o tamanho da fibra muscular no grupo sedentário, porém a associação entre exercício físico e doença periodontal foi responsável por uma diminuição significativa no perímetro das fibras musculares.
- Os animais do grupo em que ocorreu a associação entre a doença periodontal e o exercício físico foram os que apresentaram alterações mais significativas no número de células inflamatórias tanto na região central, quanto na região intermediária da lesão.
- Não foram observadas alterações histomorfológicas degenerativas no timo.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados do estudo indicam que as vias metabólicas miogênicas podem ser modificadas pela presença de doença periodontal, assim como as alterações podem ser potencializadas pela associação com o exercício físico intenso. Mais estudos são necessários para melhor compreender a ação de doenças inflamatórias crônicas sobre metabolismo muscular.

REFERÊNCIAS

AL-JANADI, M., et al. Interleukin-10 (IL-10) secretion in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: IL-10-dependent CD4⁺CD45RO⁺ T cell-B cell antibody synthesis. **J. Clin. Immunol.**, Abha, v.16, n.4, p.198-207, 1996.

ALLAVENA, P., et al. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. **Eur. J. Immunol.**, Milano, v.28, n.1, p.359-69, 1998.

AMAR, S., et al. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. Mass, v.23, n.7, p.1245-49, 2003.

ARIYAMUTHU, V.K.; NOLPH, K.D.; RINGDAHL, B.E. Periodontal disease in chronic kidney disease and end-stage renal disease patients: a review. **Cardiorenal Med.**, Columbia, v.3, n.1, p.71-8, 2013.

AUF DEM KELLER, U., et al. Systems-level analysis of proteolytic events in increased vascular permeability and complement activation in skin inflammation. **Sci. Signal.**, Vancouver, v.15, n.6, p.rs2, 2013.

BAIN, J.L., et al. Comparative gender differences in local and systemic concentrations of pro-inflammatory cytokines in rats with experimental periodontitis. **J. Periodontal Res.**, Jackson, v.44, n.1, p.133-140, 2009.

BAKKAR, N.; GUTTRIDGE, D.C. NF- κ B signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. **Physiol. Rev.**, Columbus, v.90, n.2, p.495-511, 2010.

BEGUE, G., et al. Early activation of rat skeletal muscle IL-6/STAT1/STAT3 dependent gene expression in resistance exercise linked to hypertrophy. **PLoS One**. Montpellier, v.8, n.2, p.e57141, 2013.

BEHL, Y., et al. Activation of the acquired immune response reduces coupled bone formation in response to a periodontal pathogen. **J. Immunol.**, Boston, v.181, n.12, p. 8711-18, 2008.

BORASCHI, D., et al. The gracefully aging immune system. **Sci. Transl. Med.**, Pisa, v.5, n.185, p. 185ps8, 2013.

BRESSON, D.; VON HERRATH, M. Humanizing animal models: a key to autoimmune diabetes treatment. **Sci. Transl. Med.**, La Jolla, v.3, n.68, p.68ps4, 2011.

BRUUNSGRARD, H. Physical activity modulation of systemic low-level inflammation. **JLB**. Copenhagen East, v.78, n.4, p.819-35, 2005.

CAI, B., et al. Eosinophilia of dystrophin-deficient muscle is promoted by perforin-mediated cytotoxicity by T cell effectors. **Am. J. Pathol.** Los Angeles, v.156, n.5, p.1789-96, 2000.

CANTINI, M., et al. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts *in vitro* and *in vivo*. **Neurol Sci.** Padua, v.23, p.189-194, 2002.

CORREA, F.O., et al. Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes. **J. Clin. Periodontol.**, Araraquara, v.37, n.1, p.53-58, 2010.

CRANE, J.D., et al. Massage therapy attenuates inflammatory signaling after exercise-induced muscle damage. **Sci. Transl. Med.**, Ontario, v.4, n.119, p.119ra13, 2012.

CRUZAT, V. F., et al. Current aspects of oxidative stress, physical exercise and supplementation. **Rev. Bras. Med. Sport.**, São Paulo, v.13, n.5, p.336-342, 2007.

CYPEL, M.; LIU, M.; RUBACHA, M. Repair functional of Human donor lungs by IL-10 gene therapy. **Sci. Transl. Med.**, Ontario, v.1, n.4, p.4ra9, 2009.

DE HEENS, G.L.; LOOS, B.G.; VAN DER VELDEN, U. Monozygotic twins are discordant for chronic periodontitis: white blood cell counts and cytokine production after ex vivo stimulation. **J. Clin. Periodontol.**, Amsterdam, v.37, n.2, p.129-136, 2010.

DENG, B., et al. IL-10, desencadeia alterações no fenótipo de macrófagos que promovem o crescimento e regeneração muscular. **J Immunol.** Los Angeles, v.189, n.7, p.3669-80, 2012.

EBERSOLE, J.L., CAPPELLI, D. reactants in infections and Acute-phase inflammatory diseases. **Periodontol 2000**, Lexington, v.23, n.1, p.19-49, 2000.

EBERSOLE, J.L., et al. Differential gender effects of a reduced calorie diet on systemic inflammatory and immune parameters in nonhuman primates. **J. Periodontal Res.**, Lexington, v.43, n.5, p.500-507, 2008.

ELTER, J.R., et al. The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function: a pilot trial. **American Heart Journal.** North Carolina, v.151, n.1, p.47, 2006.

FINSTERER J. Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. **BMC Musculoskelet Disord.** Vienna, v.8, n.13, p.218, 2012.

FISMAN, E. Z., et al. Interleukin-6 and the risk of future cardiovascular events in patients with angina pectoris and/or healed myocardial infarction. **Am. J. Cardiol.**, Tel-Aviv, v.98, n.1, p. 14-18, 2006.

FOLEY, J.F. No TNF- α secretion without ERK activation. **Sci Signal.**, Washington DC, v.1, p.ec15, 2008.

GARLET, G.P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **Journal of Dental Research.** Bauru, v.89, n.12, p.1349-63, 2010.

GENCO, R.J., et al. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. **Journal of Periodontology**. New York, v.76, n.11, p.2075–84, 2005.

GENCTOY, G., et al. TNFa-308 genotype and renin-angiotensin system in hemodialysis patients: an effect on inflammatory cytokine levels?. **Artif. Organs.**, Ankara, v.29, n.2, p.174-78, 2005.

GOKHALE, N.H., et al. Resistin Levels in GCF in Chronic Periodontitis Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. **J Periodontol**. Karnataka, 2013. [Epub ahead of print]

GOKUL, K. Estimation of the level of tumor necrosis factor- α in gingival crevicular fluid and serum in periodontal health and disease: a biochemical study. **Indian J. Dent. Res.**, Chennai, v.23, n.3, p.348-52, 2012.

GRAVES, D.T., et al. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**. Boston, v.35, n.2, p.89–105, 2008.

GRAVES, D.T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**. Boston, v.74, n.3, p.391–401, 2003.

HAN, X., et al. Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand by B cells in response to oral bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, Boston, v.24, n.3, p. 190-6, 2009.

HE, L.; MARNEROS, A.G. Macrophages are essential for the early wound healing response and the formation of a fibrovascular scar. **Am. J. Pathol.**, Charlestown, v.182, n.6, p.2407-17, 2013.

KELLER, C., et al. Exercise normalizes overexpression of TNF-a in knockout mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Rigshospitalet, v.321, n.1, p.179-82, 2004.

KHANDPUR, R., et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. **Sci. Transl. Med.**, Ann Arbor, v.5, n.178, p.178ra40, 2013.

KINANE, D.F., et al. Bacteraemia following periodontal procedures. **Journal of Clinical Periodontology**. Louisville, v.32, n.7, p.708–713, 2005.

LEE, S. F., et al. Immune response and alveolar bone resorption in a mouse model of treponema denticola infection. **Infect. Immun.**, Nova Scotia, v.77, n.2, p.694-8, 2009.

LEWIS, G.D.; FAREL, L.; WOOD, M.J. Metabolic signatures of exercise in human plasma. **Sci. Transl. Med.**, Boston, v.2, n.33, p.33ra37, 2010.

LIANG, S., et al. Periodontal inflammation and bone loss in aged mice. **J. Periodontal Res.**, Louisville, v.45, n.4, p.574-578, 2010.

LIU, K.Z., et al. In vivo determination of multiple indices of periodontal inflammation by optical spectroscopy. **J. Periodontal. Res.**, Winnipeg, v.44, n.1, p.117-124, 2009.

LIU, L., et al. Cyclophilin A (CypA) is associated with the inflammatory infiltration and alveolar bone destruction in an experimental periodontitis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Wuhan, v.391, n.1, p.1000-1006, 2010.

LOO, W.Y., et al. Comparing serum levels of cardiac biomarkers in cancer patients receiving chemotherapy and subjects with chronic periodontitis. **J. Transl. Med.**, Hong Kong, v.10, n.1, p.S5, 2012.

MACKINNON, L.T. Overtraining effects on immunity and performance in athletes. **Immunology and Cell Biology.**, Queensland, v.78, n.5, p.502-9, 2000.

MAEKAWA, T., et al. Porphyromonas gingivalis antigens and interleukin-6 stimulate the production of monocyte chemoattractant protein-1 via the upregulation of early growth response-1 transcription in human coronary artery endothelial cells. **J. Vasc. Res.**, Niigata, v.47, n.4, p.346-54, 2009.

MAKINO, A., et al. Nicotine involved in periodontal disease through influence on cytokine levels. **Immunol. Med. Microbiol.**, Chiba, v.52, n.2, p.282-286, 2008.

MARUYAMA, T., et al. Relationship between serum albumin concentration and periodontal condition in patients with head and neck cancer. **J Periodontol.**, Okayama, v.83, n.9, p.1110-5, 2011.

MEKORI, Y.A.; METCALFE, D.D. Mast cell in innate immunity. **Immun. Rev.**, Kfar-Saba, v.173, p.131-40, 2000.

MOORE, P.A., et al. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. **Sci.**, Rockville, v.285, n.5425, p.260-63, 1999.

MORASKA, A. et al. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, Boulder, v. 279, n. 4, p.R1321-9, 2000.

MORESI, V., et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibition of skeletal muscle regeneration is mediated by a caspase-dependent stem cell response. **Stem Cells.**, Rome, v.26, n.4, p.997-1008, 2008.

NAKAJIMA, T., et al. Periodontitis-associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. **J. Periodontal Res.**, Niigata, v.45, n.1, p.116-122, 2010.

NAYLOR, A.J.D.; LEEUWENBURGH, C. Sarcopenia: the role of apoptosis and modulation by caloric restriction. **Exerc Sport Sci Rev.** Wingate, v.36, p.19-24, 2008.

NESSE, W., et al. Increased Prevalence of Cardiovascular and Auto-Immune Diseases in Periodontitis Patients: A Cross-Sectional Study. **J Periodontol**, v.81, n.11, p.1622-8, 2010.

- NGUVEN, H.X.; TIDBALL, J.G. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of muscle cells in vitro. **J. Physiol.**, Los Angeles, v.457, p.125-32, 2003.
- NIEMAN, D.C., et al. Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run. **J. Appl. Physiol.**, Boone, v.94, p.1917-25, 2003.
- NISHIHARA, R., et al. The effect of porphyromonas gingivalis infection on cytokine levels in type 2 diabetic mice. **J. Periodontal Res.**, Tokyo, v.44, n.3, p.305-310, 2009.
- ORCHARD, J.; BEST, T.M. The management of muscle strain injuries: an early return versus the risk of recurrence. **Clin. J. Sport. Med.**, Philadelphia, v.12, n.1, p.3-5, 2002.
- PARK, S.W.; GOODPASTER, B.H.; STROTMAYER, E.S. Accelerated Loss of Skeletal Muscle Strength in Older Adults With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care.** Pochon, v.30, p.1507-12, 2007.
- PEDERSEN, B.K., et al. Searching for the exercise factor is IL-6 a candidate? **J Muscle Res Cell. Motil.** Copenhagen, v.24, p.113-9, 2003.
- PERDIGUERO, E., et al., p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. **JCB.**, Barcelona, v.195, n.2, p.307-22, 2011.
- PERDIGUERO, E., et al. MKP-1 coordinates ordered macrophage-phenotype transitions essential for stem cell-dependent tissue repair, **Cell Cycle**, Barcelona, v.11, n.5, p.877-86, 2012.
- PERVAIZ, N.; HOFFMAN-GOETZ, L. Immune cell inflammatory cytokine responses differ between central and systemic compartments in response to acute exercise in mice. **Exerc Immunol Rev.** Ontario, v.18, p.142-57, 2012.
- PETERSEN, M.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J. Appl. Physiol.**, Copenhagen, v.98, n.4, p.1154-62, 2005.
- PRILIC, M.; BEVAN, M.J. Systems-level analysis of proteolytic events in increased vascular permeability and complement activation in skin inflammation. **Sci.**, Vancouver, v.311, n.5769, p.1875-76, 2006.
- ROGERO, M.M.; MENDES, R.R.; TIRAPEGUI, J. Síndrome de overtraining. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.49, n.3, p. 359-68, 2005.
- ROUBENOFF, R. Catabolism of aging: is it an inflammatory process? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** Baltimore, v.6, p.295-9, 2003.
- SASSE, S. K. et al. Chronic voluntary wheel running facilitates corticosterone response habituation to repeated audiogenic stress exposure in male rats. **Stress**, Boulder, v.11, n.6, p.425-37, 2008.
- SIMS, N.A.; WALSH, N.C. GP130 cytokines and bone remodelling in health and disease. **BMB.**, Fitzroy, v.43, n.8, p.513-23, 2010.

STUPKA, N., et al. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. **J. Appl. Physiol.**, Ontario, v.89, n.6, p.2325-32, 2000.

SUN, X.J., et al. Elevation of C-reactive protein and interleukin-6 in plasma of patients with aggressive periodontitis. **J. Periodontal Res.**, Beijing, v.44, n.3, p.311-316, 2009.

SUNDARARAJ, K. P., et al. Interleukin-6 released from fibroblasts is essential for up-regulation of matrix metalloproteinase-1 expression by U937 macrophages in coculture: cross-talking between fibroblasts and U937 macrophages exposed to high glucose. **J. Biol. Chem.**, Charleston, v.284, n.20, p. 13714-24, 2009.

TABA, M.J.R., et al. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. **Dent. Clin. North Am.**, Ann Arbor, v.49, n.3, p.551-71, 2005.

TAYLOR, B., et al. The effect of initial treatment of periodontitis on systemic markers of inflammation and cardiovascular risk: a randomized controlled trial. **Eur. J. Oral Sci.**, Sydney, v.118, n.4, p.350-356, 2010.

TELES, R.P., et al. Salivary cytokine levels in chronic periodontitis and periodontally healthy subjects. A cross-sectional study. **J. Periodontal Res.**, Boston, v.44, n.3, p.411-417, 2009.

TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Los Angeles, v.288, n.2, p.r345-r353, 2005.

TIDBALL, J.G.; VILLALTA, S.A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, California, v.298, n.5, p.r1173-87, 2010.

TIDBALL, J.G.; VILLALTA, S.A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Los Angeles, v.298, n.5, p.1173-87, 2010.

TIDBALL, J.G.; WEHLING, H.M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice *in vivo*. **J Physiol**, Los Angeles, v.578, n.Pt 1, p.327-36, 2007.

TIMMERMAN, K.L.; VOLPI, E. Amino acid metabolism and regulatory effects in aging. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. Galveston, v.11, p.45-9, 2008.

UNANUE, E.R.; ALLEN, P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. **Sci.**, St. Louis, v.236, n.4801, p.551-57, 1987.

WEHLING, M.; SPERNICER, M.J.; TIDBALL, J.G. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in *mdx* mice. **JCB.**, Los Angeles, v.155, n.1, p.123-31, 2001.

WEHLING-HENRICKS, M., et al. Major basic protein-1 promotes fibrosis of dystrophic muscle and attenuates the cellular immune response in muscular dystrophy. **Hum Mol Genet**. Los Angeles, v.17, n.15, p.2280-92, 2008.

WEHLING-HENRICKS, M.; LEE, J.J.; TIDBALL, J.G. Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. **Neuromuscul Disord**. Los Angeles, v.14, n.8, p.483-90, 2004.

WONG, D.M., et al. Protease-activated receptor 2 has pivotal roles in cellular mechanisms involved in experimental periodontitis. **Infect. Immun.**, Clayton, v.78, n.2, p. 629-38, 2010.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 19728

Título: Impacto da condição periodontal nos níveis séricos de marcadores inflamatórios e no processo de reparo muscular de ratos wistar treinados e sedentários

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARCELO LAZZARON LAMERS - coordenador desde 01/01/2011
ANNA CHRISTINA MEDEIROS FOSSATI - pesquisador desde 01/01/2011
CASSIANO KUCHENBECKER ROSING - pesquisador desde 01/01/2011
SIMONE MARCUZZO - pesquisador desde 01/01/2011
ALESSANDRA SELINGER MAGNUSSON - Histotecnologista desde 01/01/2011

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 23/05/2011 - Sala de Reuniões do 2º andar da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 6 de Junho de 2011

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética