



NATALIA OLIVEIRA DE MOURA

**ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA E DOENÇA
PERIODONTAL INDUZIDA POR LIGADURA EM
CAMUNDONGOS**

**LAVRAS - MG
2018**

NATALIA OLIVEIRA DE MOURA

**ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA E DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA
POR LIGADURA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para obtenção do título de Doutora.

Orientador

Prof. Dr. Luciano José Pereira

Co-orientadora

Dra. Viviam de Oliveira Silva

**LAVRAS-MG
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Moura, Natalia Oliveira de.

Atividade física voluntária e doença periodontal induzida por
ligadura em camundongos / Natalia Oliveira de Moura. - 2018.
76 p.

Orientador(a): Luciano José Pereira.

Coorientador(a): Viviam de Oliveira Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Roda de atividade livre. 2. Inflamação. 3. Periodontite. I.
Pereira, Luciano José. II. Silva, Viviam de Oliveira. III. Título.

NATALIA OLIVEIRA DE MOURA

**ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA E DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA
POR LIGADURA EM CAMUNDONGOS**

**VOLUNTARY PHYSICAL ACTIVITY AND PERIODONTAL DISEASE
INDUCED BY LIGATURE IN MICE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 30 de novembro de 2018.
Prof^a. Dra. Aline Carvalho Pereira UFLA
Prof^a. Dra. Cintia Campolina Duarte Rocha da Silva FAGAMMON
Prof. Dr. Eric Francelino Andrade UFVJM
Prof. Dr. Rafael Scaf de Molon UNESP

Prof. Dr. Luciano José Pereira
Orientador

**LAVRAS-MG
2018**

A Rodrigo, meu marido, que é um exemplo de ser humano e acredita em mim sempre me apoiando e confortando em todos os momentos.

A minha mãe e meu pai (Ju), que admiro muito e que sempre me deram todo o suporte, me ajudando a ser quem sou e a enfrentar o mundo de cabeça erguida.

Ao meu irmão Caio e Tia Dri que acreditam em mim e sempre estão presentes me ensinando muitas coisas além do amor.

A toda a família e amigos que me ajudaram a seguir essa jornada de forma mais leve e prazerosa.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus pela vida, pelas oportunidades e pelas pessoas que colocou em meu caminho.

Agradeço ao Prof. Dr. Luciano José Pereira por me dar a oportunidade não só de fazer o doutorado, mas de viver novamente perto do meu marido. Obrigada por ser um exemplo de profissional e por confiar em mim e no meu trabalho. Continuo sempre aprendendo com você.

Às bancas de qualificação e defesa que contribuíram imensamente para a realização dessa tese: Professores Doutores Viviam O. Silva, Cintia C. D. R. da Silva, Renata de C. Foureaux, Eric F. Andrade, Rafael S. de Molon e Aline C. Pereira.

Aos professores que tive a oportunidade de conviver nessa jornada, por serem gigantes não só na pesquisa, mas também em sala de aula. Me inspiro em vocês e gostaria de agradecer a todos através da lembrança do querido Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa que faleceu deixando saudades. Ele foi um exemplo de inteligência e humildade, e que infelizmente não terei o prazer de sua presença em minha banca.

Agradeço a todos que me ajudaram de perto a desenvolver esse projeto (com a mão na massa): Gustavo J. S. Pereira, Larissa Jahnel, Lauana, Nicolas Tanagino, Matheus C. B. Rosa, Viviam O. Silva entre outras inúmeras pessoas.

Agradeço também a todas as colaborações dos laboratórios que me permitiram desenvolver e finalizar este trabalho. Foram muitas pessoas de boa vontade e bom coração compartilhando conhecimento e fazendo o possível para ajudar. Obrigada aos técnicos William (fisiologia), Marquinhos (anatomia animal), Érica (hospital veterinário), Tatiane (zootecnia), Fidelis (Biotério), professores Viviam O. Silva, Renata Foureaux, Roger (patologia), Lício Augusto Veloso e todos do Labsinzel (Laboratório de Sinalização Celular - UNICAMP) representando a todos os laboratórios nos quais realizei análises.

Aos meus amigos que moram longe ou perto, mas que sempre estiveram dispostos a compartilhar uma palavra de carinho e conforto, que sempre me ajudaram a encarar a vida com mais alegria e leveza, muito obrigada! Víviam, Ana Rubélia, Diana, Débora, Cíntia, Juliana (Ju), Andressa (Frô), Eric, Priscila...

A todos os amigos e colegas de laboratório que também vão se tornando pessoas para a vida: Andressa Naira, Janina, Marina...

Agradeço a Cintia, Michelle e demais colegas de trabalho da FAGAMMON, por muitas vezes facilitarem a execução do meu curso de doutorado, me apoiando ou me substituindo entre outras necessidades.

Aos alunos que acreditaram e continuam acreditando em mim e também me deram muito suporte mesmo quando eu atrasava para postar notas e faltas no portal.

Aos meus cachorros que sempre ficaram comigo me dando amor e carinho durante as centenas de noites em claro, feriados e finais de semana em frente ao computador.

Aos meus familiares que lembraram de mim muitas vezes com mensagens e telefonemas. Vocês sempre torceram por mim e me proporcionaram momentos de paz e confraternização com amor.

Ao meu irmão Caio, a Tia Dri (segunda mãe), Mãe e Ju (meu pai) que nunca me abandonaram nem por um segundo. Vocês sempre acreditaram em mim, me amaram e apoiaram

incondicionalmente, me transformando em quem sou hoje. Vocês são meus exemplos e as pessoas que mais admiro e amo nesse mundo.

Ao meu marido Rodrigo por ser a pessoa mais incrível que já conheci e por ser a pessoa mais especial da minha vida. Você é um exemplo de ser humano, de caráter e de profissional. Sem você eu não iria tão longe e não seria tão feliz e completa. Obrigada por aguentar mais essa fase difícil, por estar em minha vida e por transformá-la da melhor forma desde que você entrou nela. Te admiro e amo com todo o meu ser.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

A doença periodontal (DP), inflamação iniciada pelo biofilme dental, pode causar reabsorção óssea alveolar (ROA) e eventualmente perda dos dentes. Indivíduos fisicamente ativos apresentam menor propensão à DP quando comparados à sedentários devido ao potencial anti-inflamatório da atividade física. O presente estudo investigou a relação entre a prática de atividade física voluntária e a evolução da DP em camundongos, bem como a influência da DP sobre o comportamento de busca pela atividade física voluntária. Foram utilizados 32 camundongos machos da linhagem isogênica C57BL6, com oito semanas de idade, distribuídos em quatro grupos: Controle (C); Atividade Física Voluntária (AFV); Doença Periodontal (DP) e Doença Periodontal e Atividade Física Voluntária (DP/AFV). Os animais dos grupos AFV e DP/AFV tiveram sua atividade em uma roda de corrida livre registrada durante 30 dias. No 15º dia, os grupos DP e DP/AFV foram induzidos à DP através do protocolo de ligadura (fio de nylon alocado em torno dos segundos molares superiores). No 30º dia os animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta dos tecidos. Foram analisadas a resposta inflamatória local (citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α), a ROA (RANKL - ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B, e OPG - osteoprotegerina) e a expressão hipotalâmica de genes associados ao comportamento locomotor (BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro, GAD65 – glutamato descarboxilase, HRCT – orexina, e MCH – hormônio concentrador de melanina) através da técnica de PCR (*Polimerase chain reaction*) em tempo real. A ROA também foi analisada pela morfometria. O padrão de atividade física voluntária foi analisado através do volume total de atividade física (total de voltas) e média de velocidade (voltas/minuto) em cada período (claro ou escuro). Também foi calculado o total de horas inativas. Foi realizada Análise de Variância (*Two-way-ANOVA*) para comparação de médias entre os grupos em modelo fatorial 2x2 (induzidos à DP ou não, com acesso à roda de atividade ou não), seguida de teste *post hoc* de Bonferroni quando necessário ($p < 0.05$). Os grupos com DP apresentaram maior ROA, maior expressão gênica de RANKL e menor de OPG no tecido gengival em relação aos demais grupos. O grupo DP/AFV apresentou maior expressão gênica de OPG no tecido gengival. A indução de DP aumentou a expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α . A AFV modulou a expressão de IL-1 β e TNF- α para níveis similares ao grupo C. Após a indução à DP o grupo DP/AFV apresentou redução na velocidade média e no volume total de voltas, além de maior tempo de inatividade nos períodos noturno e diurno, quando comparado ao grupo AFV. A expressão gênica de BDNF e MCH no hipotálamo foram mais altas nos grupos DP e DP/AFV. A expressão gênica de orexina no hipotálamo foi maior nos dois grupos AFV e DP/AFV. A expressão de GAD65 foi maior nos grupos DP, AFV e DP/AFV. Conclui-se que a atividade física voluntária possui efeitos protetores contra a inflamação e ROA decorrentes da DP. Ainda, a DP reduz a atividade física voluntária, provavelmente via modulação de genes hipotalâmicos, especialmente o MCH.

Palavras-chave: Inflamação. Atividade física voluntária. Exercício voluntário. Periodontite. Roda de atividade livre. Hipotálamo. Comportamento locomotor.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD), an infection initiated by the presence of biofilm, may present alveolar bone resorption (ABR) and eventual tooth loss. Physically active individuals are less prone to PD when compared to sedentary individuals, due to the anti-inflammatory potential of physical activity. The present study investigated the relationship between the voluntary physical activity and the evolution of PD in mice, as well as the influence of PD on voluntary physical activity behavior. Thirty-two male C57BL6 isogenic mice, eight weeks old, maintained under standard conditions were distributed in four groups: Control (C); Voluntary Physical Activity (VPA); Periodontal Disease (PD) and Periodontal Disease and Voluntary Physical Activity (PD/VPA). The animals of the VPA and PD/VPA groups had its voluntary activity in a free running wheel registered in an automated acquisition system for 30 days. On the 15th day the PD and PD/VPA groups received a nylon thread around the second maxillary molar for PD induction. On the 30th day of the experiment, all animals were anesthetized and euthanized for tissue collection. Local inflammatory response (cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α), ABR (RANKL - receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand and OPG - osteoprotegerin) and hypothalamic expression of genes associated with locomotor behavior (BDNF – brain-derived neurotrophic factor, GAD65 – glutamate decarboxylase, HRCT – orexin, e MCH – melanin-concentrating hormone) were analyzed by the real-time PCR (*Polimerase chain reaction*) technique. ABR was also analyzed by morphometry. The voluntary physical activity pattern was analyzed by the total volume of voluntary physical activity (total laps) and average speed (laps/minute) in each period (light or dark). Total inactive hours were also calculated. The data were compared by Two-way ANOVA for comparison of means between groups in factorial model 2x2 (induced to PD or not, with access to the free running wheel or not), followed by Bonferroni *post hoc* test when necessary ($p < 0.05$). The groups with PD induction presented greater ABR, higher RANKL gene expression, and lower OPG in the gingival tissue than the other groups. However, the PD/VPA group presented increased gene expression of OPG in the gingival tissue. PD induction increased the expression of the inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α , but VPA modulated the expression of IL-1 β and TNF- α at levels similar to group C. After induction to PD, the PD/VPA group presented a reduction in mean velocity and total volume of laps, as well as a longer time of inactivity in both periods (nocturnal and diurnal) when compared to the AFV group. Gene expression of BDNF and MCH in the hypothalamus were higher in the PD and PD/VPA groups. The gene expression of orexin in the hypothalamus was higher in the exercised groups. Expression of GAD65 was higher in the PD, VPA and PD/VPA groups. It is concluded that voluntary physical activity has protective effects against inflammation and ABR due to PD, and that PD reduces voluntary physical activity, probably via modulation of hypothalamic genes, especially MCH.

Keywords: Inflammation. Voluntary physical activity. Voluntary exercise. Periodontitis. Free running wheel. Hypothalamus. Locomotor behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento experimental.....	55
Figura 2. Ganho de massa corporal durante o período experimental.....	59
Figura 3. Análise de reabsorção óssea alveolar (ROA) através de morfometria.....	59
Figura 4. Expressão gênica de marcadores inflamatórios no tecido gengival.....	61
Figura 5. Volume total de atividade física voluntária.....	62
Figura 6. Volume total de atividade física por período.....	63
Figura 7. Velocidade média de atividade física voluntária.....	64
Figura 8. Horas de inatividade.....	65
Figura 9. Análise da expressão gênica no hipotálamo.....	66

LISTA DE SIGLAS

AF – Atividade física
AFL – Atividade física de lazer
AFO – Atividade física ocupacional
AFV – Atividade física voluntária
AP-1 – Proteína ativadora-1
BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro
C – Controle
cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA/UFLA – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras
COA – Crista óssea alveolar
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX 1 - Ciclo-oxigenase 1
COX 2 - Ciclo-oxigenase 2
DP – Doença Periodontal
DP/AFV – Doença Periodontal + Atividade Física
DSS – Sulfato de sódio dextrano
GAD65 – Glutamato descarboxilase 65
GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HRCT – Hipocretina/orexina
IL-10 – Interleucina 10
IL-1RA – Antagonista do receptor de interleucina 1
IL-1 β – Interleucina 1 beta
IL-6 – Interleucina 6
JCE – Junção cimento-esmalte
LPS – Lipopolissacarídeos
MCH – hormônio concentrador de melanina
MET – *Metabolic equivalente* ou taxa metabólica basal
MMPs – Metaloproteinases da matriz
NF κ B – Fator nuclear kappa B

NO – Óxido nítrico

OPG – Osteoprotegerina

PBS – Tampão fosfato ou *Phosphate Buffered Saline*

PCR – *Polimerase chain reaction*

PDGF - Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

PG – Prostaglandinas

PGE2 – Prostaglandina 2

PGE2 – Prostaglandina E2

RANK - Receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANKL – Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

RNA – Ácido ribonucleico

ROA – Reabsorção Óssea Alveolar

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SIgA – Imunoglobulina A Secretora

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Doença Periodontal (DP)	15
2.2 Diagnóstico e fatores de risco para DP.....	18
2.3 Patogênese da DP.....	19
2.4 Respostas inflamatórias no periodonto.....	22
2.4.1 Citocinas	22
2.4.2 Reabsorção Óssea Alveolar.....	23
2.4.2.1 Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG)	24
2.5 Prognóstico e tratamento.....	24
2.6 Modelos animais de DP - Ligadura.....	25
2.7 Atividade Física	26
2.8 Atividade Física e inflamação.....	28
2.9 Atividade Física Voluntária.....	30
2.10 Papel do hipotálamo na Atividade Física.....	32
2.11 Ciclo Circadiano, Atividade Física e Inflamação.....	33
2.12 Atividade Física e DP.....	34
3 JUSTIFICATIVA.....	36
4 OBJETIVO GERAL.....	37
4.1 Objetivos Específicos.....	37
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	38
6 REFERÊNCIAS.....	38
SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	49
Atividade Física Voluntária E Doença Periodontal Induzida Por Ligadura Em Camundongos	50
ABSTRACT.....	50
1 INTRODUÇÃO	52
2 METODOLOGIA	53
2.1 Animais.....	54
2.2 Delineamento Experimental	54
2.3 Atividade física voluntária.....	55
2.4 Indução à DP.....	55
2.5 Coletas e Análises.....	56
2.5.1 Análise Morfométrica da Reabsorção Óssea Alveolar (ROA).....	56
2.5.2 Análises Moleculares – Extração de RNAm e PCR Tempo real.....	57
2.5.3 Análise Estatística.....	58
3 RESULTADOS.....	58
4 DISCUSSÃO.....	66
5 CONCLUSÃO	71
ACKNOWLEDGEMENTS.....	71
FORMATTING OF FUNDING SOURCES.....	72
CONFLICTS OF INTEREST	72
HIGHLIGHTS	72
REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

Doença Periodontal (DP) é um termo geral que compreende diferentes níveis de inflamação crônica iniciada frequentemente pelo acúmulo de bactérias (biofilme) na superfície dentária, que pode afetar os tecidos de suporte dos dentes (ANDRADE et al., 2018, 2017; KAUR et al., 2018; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; NUNN, 2003; PORTO et al., 2012; STANFORD; REES, 2003). A resposta local envolve a ativação de osteoclastos e consequente reabsorção óssea, podendo causar mobilidade e em casos mais severos até a perda dentária (HIGHFIELD, 2009). A presença dos micro-organismos e a consequente ativação da resposta imunológica do hospedeiro elevam os níveis de citocinas tanto no tecido periodontal como sistemicamente, causando a longo prazo, uma inflamação sistêmica de baixo grau (GOMES et al., 2013).

As DP afetam cerca de 20 a 50% da população em todo o mundo (NAZIR, 2017), sendo as condições orais mais comuns (RAITAPURO-MURRAY; MOLLESON; HUGHES, 2014), e as doenças crônicas inflamatórias mais prevalentes em humanos, constituindo um dos maiores problemas de saúde bucal pública mundial (EKE; GENCO, 2007; HE et al., 2018; JIN et al., 2011; JORDÃO et al., 2012; MONTANDON; ZUZA; DE TOLEDO, 2012). Essas condições ocorrem em indivíduos de todas as regiões e raças, caracterizando a principal razão para extrações de dente a partir dos 45 anos (JORDÃO et al., 2012; MONTANDON; ZUZA; DE TOLEDO, 2012; JIN et al., 2011; ZHANG et al., 2010; SUSIN et al., 2005).

Estudos observacionais têm demonstrado que a prática regular de atividade física pode modular a inflamação crônica (ALLEN; SUN; WOODS, 2015; BEAVERS; BRINKLEY; NICKLAS, 2010; HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008). Indivíduos fisicamente ativos podem apresentar menor propensão à DP que indivíduos sedentários (BAWADI et al., 2011). Porém, existem diversos tipos e intensidades de atividade física e considerando modelos animais, a atividade pode ainda ser forçada ou voluntária. Nesse sentido, já foi demonstrado que a atividade física forçada é capaz de reduzir inflamação e reabsorção óssea alveolar (ROA) em ratos com doença periodontal (ANDRADE et al., 2017) e em roedores com DP e diabetes (ANDRADE et al., 2018).

O exercício é considerado um fator estressante para o organismo e, quando forçado, esse aspecto pode ser acentuado. Uma vez que o estresse pode aumentar o risco de desenvolvimento da DP (DEINZER et al., 2007; GOYAL et al., 2013; HUGO et al., 2006; RAI et al., 2011; RENERS; BRECX, 2007) e pode interferir negativamente no exercício físico (STULTS-KOLEHMAINEN; SINHA, 2014), emerge a possibilidade de utilização de modelos de atividade física voluntária. Esses modelos mimetizam os benefícios da atividade física em humanos e diferem do exercício forçado por serem realizados com pouca ou nenhuma intervenção dos pesquisadores, minimizando o estresse para os animais (SEO et al., 2014). Existem desvantagens como a dificuldade para controlar a intensidade e duração do exercício, porém, é possível verificar os efeitos da atividade física sobre a DP. Outro fator interessante é que a atividade física voluntária é entendida como um aspecto comportamental (SEO et al., 2014), que eventualmente poderia ser influenciado por condições inflamatórias sistêmicas ou locais, como é o caso da DP. No estágio atual do conhecimento, estudos envolvendo a atividade física voluntária e a DP não foram encontrados.

O hipotálamo é um importante centro regulador da homeostase energética e do comportamento locomotor. Alguns neurotransmissores liberados por neurônios hipotalâmicos são capazes de influenciar a atividade física voluntária (KOSSE et al., 2017). Uma vez que tanto a DP quanto a atividade física podem modular as respostas inflamatórias (OLIVEIRA et al., 2015; PRATESI; TARANTINI; DI BARI, 2013) e comportamentais (KOSSE et al., 2017), esse estudo teve como objetivo investigar as inter-relações entre as duas condições em modelo murino e os aspectos moleculares envolvidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doença Periodontal (DP)

O termo Doença periodontal (DP) abrange múltiplos distúrbios do periodonto (HIGHFIELD, 2009; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). São doenças

infeciosas iniciadas pelo desenvolvimento de um biofilme dental, gerando uma resposta imune e inflamação (HIGHFIELD, 2009; NUNN, 2003; PORTO et al., 2012; STANFORD; REES, 2003). Isso resulta em uma série de eventos que afetam os tecidos de suporte dos dentes podendo gerar perda de fixação dental e destruição do osso alveolar, chegando em alguns casos à perda do dente. Entre as DP mais comuns estão a gengivite e a periodontite crônica (COSTA et al., 2012; HIGHFIELD, 2009; SILVA et al., 2015).

A higiene bucal ineficiente favorece a formação de um biofilme que adere à superfície do dente e se deposita no sulco gengival e na gengiva marginal, gerando uma resposta inflamatória local no hospedeiro (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; RAITAPURO-MURRAY; MOLLESON; HUGHES, 2014). Em geral o indivíduo apresenta como sintomas das gengivites, inchaço e vermelhidão no entorno dos dentes acometidos, com possível sangramento espontâneo durante escovação e uso de fio dental (HIGHFIELD, 2009).

Quando não tratada, a gengivite pode evoluir para periodontite crônica. A resposta inflamatória do hospedeiro frente ao biofilme progride para a destruição do ligamento periodontal e suas fibras colágenas, formando uma bolsa entre o dente e a gengiva, com possível retração gengival. Dessa forma ocorre a perda de junção epitelial, que quando persiste por períodos prolongados pode se estender para os tecidos mais profundos causando perda de suporte do tecido conjuntivo, reabsorção do osso alveolar e do ligamento periodontal, podendo levar à perda do dente (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2015; HIGHFIELD, 2009; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; LOCKER; SLADE; MURRAY, 1998; NEWMAN et al., 2016).

A periodontite pode ser classificada em periodontite crônica ou periodontite agressiva, podendo em ambas condições serem designadas como localizadas ou generalizadas (THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2001). Outras classificações envolvem periodontites decorrentes de doenças sistêmicas (associadas à discrasias sanguíneas ou à distúrbios genéticos), periodontite necrosante, abscessos periodontais, periodontite associada a lesões endodônticas e, por fim, deformidades e condições congênitas ou adquiridas (FINE; PATIL; LOOS, 2018; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2001).

A periodontite crônica é caracterizada por sua progressão lenta e por acometer principalmente indivíduos adultos. Por outro lado, a periodontite agressiva apresenta uma evolução rápida, ocorrendo geralmente em pacientes jovens (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2015; THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2001).

Na periodontite crônica, que é a mais prevalente, a inflamação causa a formação de bolsas periodontais que afastam a gengiva dos dentes favorecendo a adesão e formação do biofilme (HIGHFIELD, 2009), o qual pode incluir diversas colônias de bactérias como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Campylobacter spp.* (HIGHFIELD, 2009). A periodontite crônica pode ainda ser localizada (≤ 10 dentes afetados) ou generalizada (≥ 10 dos 32 dentes humanos afetados) (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

Mais de 800 espécies de micro-organismos já foram identificadas na placa dental de humanos, sendo que um único indivíduo pode apresentar cerca de 150 dessas espécies em seu biofilme, incluindo bactérias anaeróbias gram-negativas, espiroquetas e até mesmo vírus. Estudos mais recentes tem demonstrado que as DP decorrem do desequilíbrio no biofilme e não da presença de um único micro-organismo, dificultando seu tratamento (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; PÉREZ-CHAPARRO et al., 2014).

A periodontite crônica nem sempre causa dor, mas em geral além dos sinais da gengivite, o mau hálito persistente, alterações no paladar, retração gengival com mobilidade e sensibilidade aumentada dos dentes são comuns (NATIONAL INSTITUTE OF DENTAL AND CRANIOFACIAL RESEARCH, 2013).

A periodontite agressiva, por sua vez, acomete principalmente indivíduos jovens clinicamente saudáveis. Nesses casos, algumas bactérias específicas invadem a cavidade oral do hospedeiro que reage com uma resposta inflamatória intensa, levando à rápida destruição em massa do osso alveolar (CLARK; FEBBRAIO; LEVIN, 2017; FINE; PATIL; LOOS, 2018; HIGHFIELD, 2009; THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2001).

Nessa condição, um número limitado de espécies de microrganismos, tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e algumas populações de *Porphyromonas gingivalis*, estão geralmente presentes, havendo resposta inflamatória intensa, não compatível com a quantidade do biofilme (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2015; CLARK; FEBBRAIO; LEVIN, 2017; HIGHFIELD, 2009; THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2001).

Também são observados nesses pacientes, anormalidades fagocíticas, fenótipo de macrófagos hiper-responsivos, incluindo níveis elevados de PGE2 (prostaglandina E2 que estimula a reabsorção óssea) e IL-1 β (interleucina 1 beta, que sinaliza resposta inflamatória) além das proporções elevadas de bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* (HIGHFIELD, 2009; THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2001).

A resposta imunológica do hospedeiro à DP pode frequentemente ser mediada por linfócitos T e B, macrófagos e neutrófilos, que são acionados para produzir mediadores inflamatórios, incorporando citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas, metabólitos derivados do ácido araquidônico, além da ativação de osteoclastos, que contribuem para a ativação de diversas vias de degradação tecidual (MOUTSOPOULOS; MADIANOS, 2006; SILVA et al., 2017).

Em geral os tratamentos convencionais, que incluem higienização adequada, raspagem e alisamento corono-radicular; apresentam eficácia, porém a periodontite pode ser recorrente em qualquer uma de suas formas, mesmo quando tratada com sucesso, e pode ser ainda refratária, quando uma ou mais formas de periodontite não respondem ao tratamento (THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2001).

2.2 Diagnóstico e fatores de risco para DP

O diagnóstico clínico da DP é feito através do reconhecimento de vários sinais nos tecidos periodontais que demonstrem diferença do periodonto saudável (ELEY; SOORY; MANSON, 2012; HIGHFIELD, 2009). Podem ser identificadas alterações gengivais, redução

da resistência dos tecidos à sondagem periodontal e sulco gengival mais profundo ou bolsa, que refletem perda de inserção periodontal (LISTGARTEN, 1986).

Vários fatores modificáveis e não modificáveis aumentam o risco de doenças periodontais e contribuem para o seu significado clínico (NAZIR, 2017). Dentre os fatores de risco modificáveis estão o tabagismo, a má higiene bucal, mudanças hormonais femininas, aspectos nutricionais, ingestão de álcool, uso de medicamentos, estresse e aspectos psicológicos (HIGHFIELD, 2009; HUGO et al., 2006; NAZIR, 2017; NUNN, 2003; PORTO et al., 2012; ZHANG et al., 2010). Os fatores de risco não modificáveis incluem idade e hereditariedade. Existe ainda associação da DP com outros fatores como medicamentos, fatores relacionados ao dente (forma e posição), má oclusão, baixa produção de saliva, características socioeconômicas, comportamentais, genética e epigenética e composição microbial do biofilme dental, doenças sistêmicas, incluindo as doenças cardiovasculares, HIV, doenças metabólicas, adversidades na gravidez, artrite reumatoide, doenças respiratórias, doença renal crônica, câncer e comprometimento da função cognitiva (HIGHFIELD, 2009; JIN et al., 2011; JORDÃO et al., 2012; NAZIR, 2017; NUNN, 2003; PORTO et al., 2012; STANFORD; REES, 2003).

2.3 Patogênese da DP

Os tecidos epiteliais são constantemente expostos a uma variedade de bactérias, mas a maioria das pessoas mantém uma homeostase saudável. As células epiteliais contribuem para a resposta inata do hospedeiro em todos os epitélios, incluindo os orais (CHUNG et al., 2007). Assim, a progressão das DP pode causar danos permanentes e por isso exige um diagnóstico precoce com monitoramento a longo prazo (HE et al., 2018).

A periodontite é precedida pela gengivite, mas nem sempre a gengivite evolui para periodontite. O desenvolvimento da gengivite pode ser observado com clareza de forma clínica e histológica. Normalmente ocorre infiltração de células de defesa (plasmócitos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos) no tecido conjuntivo. Sua presença e seus produtos causam a perturbação da anatomia normal do tecido conjuntivo resultando em destruição do colágeno e subsequente proliferação do epitélio juncional. A vasodilatação e a maior permeabilidade

vascular levam a um maior extravasamento de fluido dos vasos e facilitam a passagem de células de defesa da vasculatura para os tecidos, resultando em edemas e eritemas (aparência clínica da gengivite) (NEWMAN et al., 2016).

As alterações histológicas gengivais podem ser separadas em lesões primária, inicial, estabelecida e avançada. De forma resumida a lesão primária corresponde aos tecidos clinicamente saudáveis, porém com presença de biofilme e resposta inflamatória de baixo grau. Ocorre vasodilatação e maior permeabilidade vascular que permitem que neutrófilos e monócitos migrem pelos tecidos conjuntivos na direção da origem do estímulo quimiotático (produtos bacterianos no sulco gengival). O fluido gengival extravasa causando diluição dos produtos bacterianos, funcionando provavelmente como uma lavagem para remoção de bactérias e seus produtos do sulco (LISTGARTEN, 1986; LISTGARTEN; HELLDÉN, 1978; NEWMAN et al., 2016; PAGE; SCHROEDER, 1976).

No início da gengivite, existe proliferação de capilares e vasodilatação persistente causando um aspecto eritematoso nas gengivas. O aumento do fluxo sanguíneo leva mais neutrófilos até o sulco gengival para fagocitar bactérias. Dessa forma, neutrófilos e linfócitos predominam no infiltrado, enquanto fibroblastos se degeneram (apoptose) aumentando o espaço disponível para infiltração de leucócitos. Ocorre então a destruição do colágeno e as células epiteliais basais começam a se multiplicar na tentativa de manter intacta uma barreira contra bactérias e seus produtos (LISTGARTEN, 1986; NEWMAN et al., 2016; PAGE; SCHROEDER, 1976). A gengiva pode apresentar aspecto intumescido como consequência do edema dos seus tecidos e o sulco gengival pode ficar ligeiramente mais profundo, permitindo que o biofilme se prolifere no sentido apical. Assim a lesão inicial pode persistir indefinidamente, ou progredir (LISTGARTEN, 1986; NEWMAN et al., 2016).

A lesão estabelecida corresponde à gengivite crônica e depende de diversos fatores, que incluem a composição e quantidade de biofilme, fatores de suscetibilidade do hospedeiro e fatores de risco (locais e sistêmicos). O infiltrado passa a ocupar um volume considerável dos tecidos conjuntivos inflamados e o colágeno continua a ser destruído por causa da proliferação do epitélio para os espaços de tecido conjuntivo. Forma-se uma bolsa epitelial decorrente do acúmulo de neutrófilos que liberam seu conteúdo lisossômico extracelularmente para tentar

eliminar bactérias não fagocitadas. Essa bolsa não adere a superfície do dente, e é mais permeável à passagem de substâncias sendo menos capaz de resistir à passagem da sonda periodontal, causando sangramento. Este contexto acaba por causar mais destruição tecidual (LISTGARTEN, 1986; LISTGARTEN; HELLDÉN, 1978; NEWMAN et al., 2016; PAGE; SCHROEDER, 1976).

Por fim, a lesão avançada define a transição para periodontite (PAGE; SCHROEDER, 1976), evidenciada pela destruição do colágeno que se estende para o ligamento periodontal e o osso alveolar. Os neutrófilos predominam na bolsa epitelial, enquanto plasmócitos predominam nos tecidos conjuntivos. O epitélio juncional migra apicalmente para as áreas carentes de colágeno para manter uma barreira epitelial. A reabsorção óssea osteoclástica é iniciada e o osso recua da frente inflamatória avançada como um mecanismo de defesa para evitar a disseminação de bactérias (LISTGARTEN, 1986; LISTGARTEN; HELLDÉN, 1978; NEWMAN et al., 2016; PAGE; SCHROEDER, 1976).

À medida que a bolsa se aprofunda o biofilme se prolifera no sentido apical em um ambiente favorável para diversas espécies de patógenos periodontais. A bolsa se torna um ambiente protegido, úmido, quente e anaeróbio com um suprimento de nutrientes imediato. Uma vez que as bactérias estão na bolsa periodontal, e não no interior do tecido, elas não são eliminadas de forma significativa pela resposta inflamatória (LISTGARTEN, 1986; LISTGARTEN; HELLDÉN, 1978; NEWMAN et al., 2016; PAGE; SCHROEDER, 1976).

Ocorre um ciclo que faz persistir a inflamação crônica e o dano tecidual. Ou seja, o dano tecidual é causado principalmente pela resposta inflamatória, mas o biofilme, que inicia todo este quadro, não é eliminado. Assim, persiste a destruição de ligamento periodontal e fibras de colágeno, a reabsorção óssea avança e o epitélio juncional migra apicalmente para manter uma barreira intacta, causando aumento da bolsa que se aprofunda de modo fracionado. Neste quadro, é difícil a remoção de bactérias e o rompimento do biofilme somente por meio da higiene oral, possibilitando a continuação do ciclo (LISTGARTEN, 1986; NEWMAN et al., 2016; PAGE; SCHROEDER, 1976).

2.4 Respostas inflamatórias no periodonto

Algumas moléculas específicas sinalizam o dano tecidual e causam a resposta inflamatória. Elas são divididas em dois grupos: derivadas da microbiota subgingival e derivadas da resposta imunoinflamatória do hospedeiro, sendo esta última a maior responsável por destruição tecidual do periodonto. As bactérias, apesar de iniciarem e manterem a inflamação, são responsáveis por uma pequena proporção do dano (NEWMAN et al., 2016).

As bactérias subgingivais tem como função primária na patogênese periodontal, ativar respostas inflamatórias, que proporcionam fontes de nutrientes, beneficiando as bactérias situadas na bolsa e resultando em dano tecidual. Elas também contribuem diretamente para a destruição do periodonto através da liberação de substâncias nocivas. O hospedeiro passa a apresentar mediadores inflamatórios após ação de lipopolissacarídeos (LPS), enzimas bacterianas e produtos nocivos derivados das bactérias (NEWMAN et al., 2016). Ou seja, os processos inflamatórios e imunes que são desenvolvidos nos tecidos periodontais em resposta à presença de longo prazo do biofilme subgingival são inicialmente protetores, mas cronicamente acabam por causar considerável dano tecidual. Alguns dos mediadores que regem as respostas do hospedeiro são as citocinas (NEWMAN et al., 2016).

2.4.1 Citocinas

As citocinas desempenham um papel fundamental na inflamação e na DP. Elas são proteínas solúveis que agem como mensageiras após se ligarem a seus receptores celulares específicos. Essas ligações iniciam cascatas de sinalização intracelular que resultam em mudanças fenotípicas na célula (NEWMAN et al., 2016).

Essas proteínas podem ser produzidas temporariamente por diversos tipos de células, incluindo as células inflamatórias infiltradas e as células periodontais. As citocinas são eficazes em baixas concentrações e agem de forma local, sinalizando, propagando e amplificando as respostas imunes, sendo fundamentais na regulação da resposta imunoinflamatória e no

combate a infecções. Entretanto, elas podem causar efeitos biológicos profundos que ocasionam inflamação crônica e destruição tecidual caracterizando a DP (NEWMAN et al., 2016).

As citocinas reúnem aspectos da imunidade inata e adquirida atuando em redes flexíveis e complexas que podem envolver efeitos pró e anti-inflamatórios, exercendo funções em todos os estágios da resposta imune da DP. Entre as mais importantes e estudadas na periodontite, estão as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 que possuem papéis no início, regulação e manutenção das respostas imunes inatas no periodonto, resultando em alterações vasculares e na migração das células efetoras (como neutrófilos) para os tecidos periodontais (CARDOSO; REIS; MANZANARES-CÉSPEDES, 2018; NEWMAN et al., 2016).

A destruição crônica do periodonto é causada principalmente pela resposta das células T no controle da imunidade local. Entretanto, o papel das células B na manutenção do periodonto e desenvolvimento da DP não foi completamente elucidado. A presença de infiltrados inflamatórios com linfócitos B (plasmócitos) marca lesões decorrentes da periodontite. Indivíduos com periodontite apresentam alta expressão de citocinas envolvidas com respostas de células B, incluindo a IL-10 e IL-6. Além disso, as células B de memória foram identificadas no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio juncional da gengiva saudável, sugerindo uma memória na manutenção da homeostase periodontal (MAHANONDA et al., 2016).

2.4.2 Reabsorção Óssea Alveolar

Conforme a inflamação se aproxima do osso alveolar, se inicia a reabsorção óssea osteoclástica, como tentativa de evitar a invasão bacteriana. Contudo, essa tentativa acaba por causar a mobilidade do dente e até mesmo a sua perda. Em geral a reabsorção do osso alveolar ocorre simultaneamente à destruição do ligamento periodontal (NEWMAN et al., 2016).

Dois fatores críticos determinam a ocorrência da reabsorção óssea: a concentração de mediadores inflamatórios nos tecidos gengivais em quantidade suficiente para ativar as vias de reabsorção óssea, e a penetração dos mediadores inflamatórios no osso alveolar a uma distância crítica (NEWMAN et al., 2016).

2.4.2.1 Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG)

Existe um sistema fundamental no controle da reabsorção óssea, que inclui a RANKL e a OPG. A RANKL é um ligante do receptor de superfície celular expresso por células progenitoras de osteoclastos e pelos próprios osteoclastos maduros. Ele se liga ao RANK (receptor ativador do fator nuclear κ B), expresso por células estromais da medula óssea, osteoblastos e fibroblastos, resultando na diferenciação e ativação dos osteoclastos (reabsorção óssea) (NEWMAN et al., 2016; TAUBMAN; KAWAI; HAN, 2007).

Outro ligante, também produzido por células estromais da medula óssea, osteoblastos e fibroblastos, é a OPG que pode se unir à RANKL, impedindo a ligação desta última com o RANK. Dessa forma a OPG inibe a diferenciação e ativação de osteoclastos evitando a reabsorção óssea (NEWMAN et al., 2016; TAUBMAN; KAWAI; HAN, 2007).

A IL-1 β e o TNF- α regulam a expressão de RANKL e OPG. Nos indivíduos com periodontite, os níveis elevados de citocinas e células infiltradas resultam na ativação dos osteoclastos via RANK, causando reabsorção óssea alveolar. Assim, existe uma razão desbalanceada de RANKL/OPG, uma vez que na DP se apresenta maior expressão de RANKL e menor de OPG (NEWMAN et al., 2016; TAUBMAN; KAWAI; HAN, 2007).

2.5 Prognóstico e tratamento

Conhecendo a progressão da DP, é clara a necessidade de prevenção, identificação e tratamento precoces para evitar maiores complicações. Em estágios iniciais, bons hábitos de escovação e uso de fio dental frequente são imprescindíveis. Em casos mais graves é necessário remover o cálculo por meio de raspagem e alisamento corono-radicular. Existe ainda a possibilidade de tratamento e controle da infecção com uso de antibióticos e anti-inflamatórios. Em alguns casos de periodontite é necessária a cirurgia periodontal para a recomposição óssea ou da gengiva (NAZIR, 2017).

A dieta também é fundamental na prevenção de DP, embora seja mais importante para a prevenção de cáries (NAZIR, 2017). A má alimentação pode acelerar a progressão de DP, porém a ingestão de uma dieta rica em frutas e vegetais, com baixos teores de gorduras e açúcares colaboram com a saúde periodontal (BRANCH-MAYS et al., 2008). Sabe-se que a ingestão de probióticos pode reduzir efeitos da DP como a reabsorção óssea (FOUREAUX et al., 2014; SILVA et al., 2015). Além disso, as vitaminas C e E possuem propriedades antioxidantes que ajudam a reduzir a formação de radicais livres advindos de processos inflamatórios (MOYNIHAN, 2005).

Os tratamentos são eficazes, e devem ser mantidos para evitar recorrências. Alguns tratamentos não farmacológicos, como o laser (ZHAO et al., 2014), probióticos e prebióticos (FOUREAUX et al., 2014; SILVA et al., 2017) e o exercício físico (ANDRADE et al., 2017), têm se mostrado promissores na prevenção e tratamento de doenças periodontais, ainda que sejam escassos os trabalhos científicos envolvendo estes dois fatores (DP e exercícios).

2.6 Modelos animais de DP - Ligadura

Existem diversos modelos para indução de DP em camundongos e ratos. Entre eles estão a colocação de ligadura (ANDRADE et al., 2017; DE MOLON et al., 2016; GARCIA DE AQUINO et al., 2009; GRAVES et al., 2012; MOLON, 2012), a introdução de microorganismos patogênicos por meio de gavagem (DE MOLON et al., 2016; GRAVES et al., 2012) e por meio de injeções de bactérias inativadas (BEZERRA et al., 2002; GRAVES et al., 2012) bem como LPS bacteriano no sulco gengival ou cavidade oral dos animais (DE MOLON et al., 2016; GARCIA DE AQUINO et al., 2009; GRAVES et al., 2012), entre outros (GRAVES et al., 2012).

A DP induzida por ligadura é um dos modelos mais utilizados em pesquisas periodontais (ANDRADE et al., 2017; DE MOLON et al., 2016; LIN et al., 2014). Este modelo foi descrito em ratos em 1966 (ROVIN; COSTICH; GORDON, 1966). Nesta técnica, um fio de algodão, seda ou nylon é colocado na área cervical dos molares maxilares ou mandibulares de roedores para induzir grande acúmulo de placa e ulceração do epitélio do sulco (GRAVES et al., 2012;

MOLON, 2012). A placa aderida sobre o fio facilita a invasão para o tecido conjuntivo e leva a alterações no tecido periodontal. Essas alterações são similares às observadas em periodontites humanas e incluem a ruptura e migração apical do epitélio juncional, influxo de células inflamatórias e perda das fibras do ligamento periodontal além de destruição óssea (KLAUSEN, 1991).

Modelos de ligadura são considerados consistentes para mimetizar a DP, uma vez que resultam em lesões semelhantes às produzidas pela periodontite, com migração apical do epitélio juncional e reabsorção óssea (ACHONG et al., 2003). Esse modelo exhibe, após sete dias da alocação da ligadura, uma fase aguda de inflamação, e após 21 dias, uma migração apical do epitélio juncional com consequente reabsorção óssea (ACHONG et al., 2003). Alguns estudos verificaram ROA com apenas 14 dias de indução à DP por meio de ligadura (ANDRADE et al., 2017; LIN et al., 2017; GARCIA DE AQUINO et al., 2009).

Inicialmente ocorre rápida reabsorção óssea, seguida por uma diminuição na intensidade da destruição tornando-se uma reação crônica (GARCIA DE AQUINO et al., 2009; GRAVES et al., 2012; MOLON, 2012). Visando uma indução ainda mais rápida e evidente da DP, alguns pesquisadores utilizaram ligaduras embebidas em bactérias periodonto-patogênicas (LI; AMAR, 2007; YUAN et al., 2011).

Um estudo comparou a indução à DP através de ligadura e injeção com lipopolissacarídeo de bactéria (LPS) em ratos Wistar. Os pesquisadores verificaram que os dois protocolos foram eficazes na indução à doença. Além disso, os dois modelos utilizados apresentaram pico inflamatório no décimo quinto dia pós indução (GARCIA DE AQUINO et al., 2009).

2.7 Atividade Física

A atividade física (AF) pode ser definida como qualquer movimento corporal originado pela contração da musculatura esquelética promovendo aumento do gasto energético além dos níveis basais (HOWLEY, 2001). A participação em atividades físicas proporciona benefícios à saúde e resulta em níveis mais elevados de aptidão física (HASKELL et al., 2007), além de

redução do risco de doenças crônicas como câncer, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares, e de mortalidade relacionada ao sedentarismo (BOOTH et al., 2000; KESANIEMI et al., 2001).

Existe diferença entre a atividade física ocupacional e de lazer. Atividade física ocupacional (AFO) está associada à jornada de trabalho que dura geralmente 8h/dia, enquanto a atividade física de lazer (AFL) compreende as atividades durante o tempo livre.

A AFL ocorre de acordo com os interesses e necessidades pessoais, incluindo esportes, programas de exercícios, caminhadas, dança, atividades domésticas, entre outras inúmeras possibilidades que resultam da atividade física espontânea e do exercício voluntário (HOWLEY, 2001). Essas promovem gasto energético, embora a intensidade e a duração possam variar significativamente (BHERER; ERICKSON; LIU-AMBROSE, 2013; HOWLEY, 2001).

O exercício físico é considerado uma subcategoria de AFL em que são realizados movimentos corporais planejados, estruturados e repetitivos para melhorar ou manter um ou mais componentes da aptidão física (BHERER; ERICKSON; LIU-AMBROSE, 2013; HOWLEY, 2001). É uma atividade multifatorial que pode afetar todos os órgãos e tecidos corporais (AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION, 2007), resultando diversos benefícios para a saúde, cognição e humor (BHERER; ERICKSON; LIU-AMBROSE, 2013).

No ano 2000, o sedentarismo foi responsável por aproximadamente 250 mil mortes anuais, além de um gasto de aproximadamente \$1 trilhão de dólares por ano com saúde (BOOTH et al., 2000). A prevalência de inatividade física foi avaliada em 76 países, através de uma amostra composta por quase 300.000 indivíduos com 15 anos ou mais. Este estudo revelou que um em cada cinco adultos em todo o mundo é fisicamente inativo e que o sedentarismo foi mais prevalente nos países desenvolvidos e entre mulheres e idosos (DUMITH et al., 2011). Em 2012, a inatividade física se tornou a quarta maior causa de mortes pelo mundo (KOHL et al., 2012), e em 2013 custou cerca de \$54 bilhões de dólares em todo o mundo (DING et al., 2016).

De forma contrária aos efeitos causados pelo sedentarismo (AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION, 2007; BOOTH et al., 2000), o exercício crônico está

associado com uma menor incidência e prevalência de doenças metabólicas (BOOTH et al., 2000). O exercício é uma intervenção simples e de baixo custo que pode ser quantificada de maneira direta tanto em animais quanto em humanos (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985; EGAN; ZIERATH, 2013; NELSON et al., 2007). Tanto a atividade física quanto o exercício funcionam como um processo fisiológico para prevenir, manter e regular diversas condições crônicas, como a síndrome metabólica (SEO et al., 2014) e possivelmente a DP crônica.

Sabe-se que o exercício físico causa inúmeros benefícios à saúde, porém as principais alterações metabólicas resultantes do exercício e seus mecanismos subjacentes permanecem em grande parte desconhecidas. O tipo e intensidade de exercício necessário para adquirir, manter e melhorar a saúde, ou ainda promover a recuperação após uma doença ainda não foram totalmente elucidados (SEO et al., 2014).

Os efeitos benéficos ou adversos da intervenção com exercícios como forma de tratamento para certas condições devem ser testados antes de sua utilização clínica. Porém considerando as condições éticas e dificuldades para realização de algumas técnicas invasivas em pesquisas com seres humanos, modelos de exercício com animais tem sido amplamente desenvolvidos e utilizados com o objetivo de simular as atividades físicas de humanos (CHOLEWA et al., 2014; SEO et al., 2014; WANG; WISLOFF; KEMI, 2010).

2.8 Atividade Física e inflamação

Durante e após o exercício agudo ocorrem interações entre células imunes, citocinas e outros componentes intramusculares que criam um meio inflamatório responsável pela recuperação e adaptação à sobrecarga imposta (ALLEN; SUN; WOODS, 2015). Inicialmente ocorre uma resposta pró-inflamatória com duração entre 1,5 e 24 horas após a atividade física (variando de acordo com duração, intensidade, etc.). Em seguida ocorre uma resposta muscular anti-inflamatória regenerativa com duração entre 24 e 72 horas. (ALLEN; SUN; WOODS, 2015).

No exercício físico crônico, ocorre redução da inflamação de baixo grau, prevenindo ou atenuando doenças metabólicas, como diabetes tipo 2, aterosclerose, câncer e depressão (ZAWADZKA; JAGODZIŃSKI, 2017). Em pacientes com insuficiência cardíaca crônica, o exercício foi capaz de atenuar o processo de desgaste catabólico associado à progressão da doença e reduzir significativamente a expressão muscular de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (GIELEN et al., 2003). Os efeitos anti-inflamatórios decorrentes do exercício crônico incluem algumas ações dependentes de alterações na massa de tecido adiposo (ALLEN; SUN; WOODS, 2015).

Esses efeitos pleiotrópicos da atividade física também são altamente dependentes do tipo de contração muscular (excêntrica, concêntrica, isométrica), da intensidade, da duração e da familiaridade com a movimentação (ALLEN; SUN; WOODS, 2015). Após exercícios exaustivos fatores de transcrição envolvidos na inflamação, como a proteína ativadora-1 (AP-1) e o fator nuclear kappa B (NFkB), são ativados (HOLLANDER et al., 2001). A produção de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (ROS), pode ativar a via NFkB, estimulando a produção de citocinas no músculo esquelético (NIESS; SIMON, 2007; SCHEELE; NIELSEN; PEDERSEN, 2009). Essas citocinas derivadas do músculos (miocinas) possuem propriedades anti-inflamatórias e metabólicas (SCHEELE; NIELSEN; PEDERSEN, 2009).

Assim, o exercício causa aumento significativo nas miocinas circulantes, como a IL-6, com subsequente liberação e aumento das citocinas anti-inflamatórias circulantes (IL-10 e IL-1RA) que atuam antagonizando as ações da IL-1 β e TNF- α (ALLEN; SUN; WOODS, 2015; PETERSEN; OGAWA, 2005). Acreditava-se que a elevação da IL-6 induzida pelo exercício fosse uma resposta inflamatória causada pelo dano muscular. Entretanto, ocorre aumento na expressão genica de IL-6 muscular logo após contrações concêntricas e excêntricas, independentemente do tipo de fibra muscular (JONSDOTTIR et al., 2000).

Embora as respostas das citocinas ao exercício e à sepse sejam semelhantes, existem diferenças. Durante a sepse, ocorre aumento rápido e acentuado de TNF- α circulante, seguido por um aumento na IL-6. Em contrapartida, durante o exercício, o aumento de IL-6 não é precedido por aumentos nos níveis de TNF- α (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008). A atividade física voluntária realizada por camundongos C57BL6 idosos por dois meses é capaz de proteger

os animais de respostas inflamatórias e pró-coagulantes induzidas pela sepse (TYML et al., 2017).

A atividade física inicia uma cascata de eventos inflamatórios que, a longo prazo, levam à melhora da imunidade (ALLEN; SUN; WOODS, 2015; ZAWADZKA; JAGODZIŃSKI, 2017). Todos estes eventos de sinalização intracelulares afetam as células musculares e tecidos adjacentes (NIESS; SIMON, 2007), induzindo mecanismos anti-inflamatórios (SCHEELE; NIELSEN; PEDERSEN, 2009) com efeitos de longo prazo sobre a expressão gênica muscular e saúde (ALLEN; SUN; WOODS, 2015; ZAWADZKA; JAGODZIŃSKI, 2017).

2.9 Atividade Física Voluntária

Existe uma variedade de modelos experimentais desenvolvidos para animais, de forma a simular as atividades físicas humanas (BERANGER et al., 2013; CHOLEWA et al., 2014; WANG; WISLOFF; KEMI, 2010) e colaborar com o entendimento dos mecanismos do exercício (CASSILHAS et al., 2013; EGAN; ZIERATH, 2013). Uma das vantagens na utilização desses modelos é o controle da duração e intensidade do exercício (SEO et al., 2014).

Em roedores o exercício pode ser voluntário (rodas de atividade) ou forçado (natação, esteira, escada, etc.). Contudo, não existe um padrão ouro de modelos animais de exercício para manter ou melhorar o estado de saúde. Isso ocorre porque existem muitas variáveis a serem consideradas, tais como o tipo de exercício (aeróbio ou anaeróbio), a duração (exercício crônico ou agudo) e o período em que será executado (manhã, tarde ou noite) (SEO et al., 2014).

Embora o exercício possa ser reconhecido como um tipo de estresse (DROSTE et al., 2007), quando realizado de forma voluntária, é a intervenção mais eficaz na diminuição da resposta ao estresse comparado ao exercício forçado ou involuntário (CHEN et al., 2011; SEO et al., 2014). A roda de atividade livre se enquadra nos modelos de atividade física aeróbia e é considerada como uma atividade voluntária (AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY, 2006; DE BONO et al., 2006; KE et al., 2011). Estas rodas são feitas de aço inoxidável e plástico ou de uma pista de corrida rotativa inclinada. Em geral esses aparatos são utilizados em pesquisas que visam examinar o exercício crônico em espécies de roedores (SEO et al., 2014).

Quando comparada a outros tipos de exercício, a corrida nas rodas de atividade tem a vantagem da voluntariedade. Desta forma, o exercício pode ser realizado com intervenção mínima do investigador e pouco estresse para os animais que podem ainda aumentar a atividade física a longo prazo. Como desvantagens, ocorrem a impossibilidade em controlar a intensidade e duração do exercício, a impossibilidade de aplicação para estudos relacionados com fadiga e exaustão e a possibilidade de quebrar unhas ou causar escoriações nas patas traseiras (SEO et al., 2014).

Entre as aplicações já registradas, a roda de atividade voluntária foi utilizada para estudos envolvendo envelhecimento, pesquisa comportamental, isquemia cerebral, metabolismo ósseo, câncer, diabetes mellitus, emoção, função cardíaca, doença renal, doença hepática, doença neuromuscular, fisiologia muscular, obesidade, reabilitação de derrame cerebral, entre outras condições (SEO et al., 2014).

A corrida em roda de atividade livre pode ser adequada para estudos de envelhecimento, uma vez que roedores podem ser alojados em gaiolas contendo rodas de atividade por longos períodos de tempo com interrupção mínima por parte dos pesquisadores (SEO et al., 2014). Por outro lado, esse tipo de exercício não é adequado para estudos com o objetivo de explorar adaptações agudas, fadiga ou exaustão pós-exercício. Isso ocorre porque o investigador não pode regular facilmente a duração ou intensidade do comportamento de corrida (SEO et al., 2014).

É importante ressaltar que a atividade física voluntária nas rodas difere da movimentação espontânea, a qual inclui qualquer deslocamento realizado pelo animal no ambiente, mas fora da roda de atividade (VILLABLANCA et al., 2015).

Embora os modelos de exercícios baseados em animais tenham algumas limitações, o conhecimento fisiológico obtido através deles fornecerá *insights* sobre a fisiologia do exercício humano. Assim, a aplicação dos resultados pode beneficiar os seres humanos melhorando o estado de saúde e diminuindo o resultado prejudicial do exercício inadequado (SEO et al., 2014).

2.10 Papel do hipotálamo na Atividade Física

O hipotálamo, especialmente o hipotálamo lateral, contém neurônios de várias classes moleculares distintas que são responsáveis por diversos comportamentos fisiológicos vitais, incluindo a locomoção. Danos no hipotálamo lateral podem causar inatividade física em mamíferos, mas as ações do hipotálamo para regular a atividade física apropriada ainda não foram totalmente elucidadas (KOSSE et al., 2017).

Dentre as células hipotalâmicas, estão os neurônios produtores de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), uma importante proteína envolvida na aprendizagem, plasticidade sináptica e memória, melhora cognitiva e redução de ansiedade e depressão (MOLTENI; YING; GÓMEZ-PINILLA, 2002; SLEIMAN et al., 2016). Sugere-se também que o aumento da expressão dessa proteína possa exercer efeitos pró e/ou anti-inflamatórios. A inflamação pode induzir a produção de BDNF, mas indivíduos que realizam exercício moderado também apresentaram aumentos na expressão dessas proteínas (PAPATHANASSOGLU; MILTIADOUS; KARANIKOLA, 2015).

Estudos relatam que o BDNF também é modulado pela perda de dentes (TAKEDA et al., 2016; YAMAZAKI et al., 2008). Nesse sentido, quatro semanas após a perda dos molares superiores, não apresentou efeitos sobre a memória ou expressão genica de BDNF no hipocampo, porém após 16 semanas da perda dos dentes, camundongos C57BL6 apresentaram comprometimento da memória e diminuição da expressão genica de BDNF no hipocampo (TAKEDA et al., 2016).

A orexina, também conhecida como hipocretina (HRCT) é outro neuropeptídeo sintetizado por neurônios do núcleo arqueado e do hipotálamo lateral. A orexina estimula a ingestão alimentar e está relacionada com a neurogênese e função do hipocampo, e seus níveis são aumentados com o exercício físico (CHIEFFI et al., 2017). Os neurônios orexigênicos também foram relacionados com maior excitação e locomoção (PEYRON et al., 1998; SUTCLIFFE; DE LECEA, 2002; YAMANAKA et al., 2003).

Neurônios hipotalâmicos também expressam o ácido glutâmico descarboxilase 65 (GAD65) (KARNANI et al., 2013). Esses neurônios são estimulados pelo estresse e também

pela orexina, promovendo a locomoção normal enquanto sua hiperatividade causa hiperlocomoção (KOSSE et al., 2017). A ativação da orexina sinaliza e ativa os neurônios GAD65 do hipotálamo lateral. Essa ativação rápida precede e acompanha momentos agudos de alta atividade física voluntária. O silenciamento genético de GAD65 deprimiu a locomoção voluntária enquanto a superexpressão de GAD65 promove uma hiperlocomoção (KOSSE et al., 2017).

Por outro lado, os neurônios hipotalâmicos produtores de MCH (hormônio concentrador de melanina) foram relacionados à redução da locomoção e diminuição da termogênese (WHIDDON; PALMITER, 2013), modulando o balanço energético (DINIZ; BITTENCOURT, 2017; JANG et al., 2018; WILLIE et al., 2008). O MCH diminui o gasto de energia para evitar estados de balanço energético negativo ou para sustentar estados de balanço energético positivo (DINIZ; BITTENCOURT, 2017; JANG et al., 2018). Também foi proposto que o MCH tenha um papel analgésico, já que camundongos C57BL6 knockout para MCH apresentam menor limiar para dor, enquanto camundongos que receberam MCH intranasal aumentaram seu limiar para dor (JANG et al., 2018).

2.11 Ciclo Circadiano, Atividade Física e Inflamação

O ciclo circadiano é regido por um relógio no sistema nervoso central, localizado no núcleo supraquiasmático dentro do hipotálamo, e pelos relógios periféricos, localizados em quase todos os tecidos e sistemas corporais (HOWER; HARPER; BUFORD, 2018; SCHEIERMANN; KUNISAKI; FRENETTE, 2013; WOLFF; ESSER, 2012). O relógio central é composto por múltiplos fatores de transcrição, que sincronizam múltiplos relógios periféricos que possuem os mesmos componentes moleculares em diversas células de vários tecidos, incluindo macrófagos e linfócitos (KELLER et al., 2009; SCHEIERMANN; KUNISAKI; FRENETTE, 2013). A manutenção ou alteração desse ciclo depende da hora do dia e pode ocorrer através de influências ambientais como sinais luminosos, inflamação e atividade física (HOWER; HARPER; BUFORD, 2018; SCHEIERMANN; KUNISAKI; FRENETTE, 2013).

A alteração do ciclo circadiano foi associada à diversas doenças inflamatórias. Em humanos houve associação com a artrite reumatoide e rinite alérgica, enquanto em ratos foi associada com indução de inflamação através de LPS e TNF entre outros modelos (SCHEIERMANN; KUNISAKI; FRENETTE, 2013).

O músculo esquelético e conseqüentemente o exercício físico representam um importante relógio periférico, regulando o ciclo circadiano e o desenvolvimento humano, assim como o envelhecimento e a doença (AOYAMA; SHIBATA, 2017; MORGAN; CORRIGAN; BAUNE, 2015; SCHRODER et al., 2015). Além, disso, o exercício também promove a produção e liberação de melatonina melhorando a qualidade do sono (LEONARDO-MENDONÇA et al., 2015). Por outro lado, o ciclo circadiano de um animal pode ser alterado em situações como escuridão ou corrida livre constantes (ECKEL-MAHAN; SASSONE-CORSI, 2015).

Camundongos C57BL6 mantidos em exposição direta ao ciclo escuro tiveram a movimentação espontânea medida por sensor térmico e tiveram acesso à roda de atividade livre durante três horas diárias por 80 dias. Após esse período os animais não tinham mais o acesso às rodas, porém o comportamento da movimentação espontânea aumentada nos momentos que precediam o acesso habitual às rodas se manteve inalterado. Os autores relatam que a exposição diária à roda, mesmo com 24 horas de ciclo escuro atuou como um modelador do ciclo circadiano (YAMANAKA; HONMA; HONMA, 2013).

A duração e a intensidade do exercício necessários para alterar o ciclo circadiano ainda não foram determinadas, porém já foi demonstrado que quatro semanas de exercício de resistência de baixa intensidade foram suficientes para alterar o relógio circadiano e a ciclo circadiano de camundongos (WOLFF; ESSER, 2012).

2.12 Atividade Física e DP

A relação entre a prática de exercícios e o periodonto tem sido observada na literatura (AL-ZAHRANI; BORAWSKI; BISSADA, 2005b; HAYASHIDA et al., 2009; JÖNSSON et al., 2014). Manter o peso adequado, praticar exercício físico nos níveis recomendados e ingerir

alimentos saudáveis são hábitos conhecidos por melhorar a saúde geral e estão sendo relacionados com a melhor saúde periodontal e com uma menor propensão no desenvolvimento de formas mais graves de DP (AL-ZAHRANI; BORAWSKI; BISSADA, 2005a; BAWADI et al., 2011; JOSHIPURA, 2006).

Alguns estudos mostram que a prática de atividade física melhora ou impede a progressão da DP (AL-ZAHRANI, 2006; AL-ZAHRANI; BORAWSKI; BISSADA, 2005b; BAWADI et al., 2011), enquanto outros não observaram diferenças (CUETO et al., 2005; DEMMER et al., 2010; IWASAKI et al., 2016) ou relataram piora (ISLAM et al., 2015; SPALJ et al., 2008).

Considerando que os vários biomarcadores pró-inflamatórios estão envolvidos tanto na DP como no metabolismo muscular (PRATESI; TARANTINI; DI BARI, 2013) é plausível que a DP possa influenciar a atividade física ou vice-versa (OLIVEIRA et al., 2015). Indivíduos fisicamente ativos apresentam menor propensão à DP quando comparados à indivíduos sedentários (BAWADI et al., 2011), já que a DP também causa resposta inflamatória que pode ser regulada então pela atividade física constante.

A atividade física melhora a sensibilidade à insulina e o metabolismo da glicose, podendo afetar a incidência de DP. Um estudo realizado nos Estados Unidos avaliou estes parâmetros em 39.461 profissionais de saúde do sexo masculino, com idade entre 40 e 75 anos, livres de periodontite, doença coronariana e acidente vascular cerebral no início do experimento. Os pesquisadores verificaram que o risco de periodontite diminuiu em 3% para cada aumento de 10 MET (*metabolic equivalent* ou taxa metabólica basal) na atividade física. Os participantes com maior volume de atividade física apresentaram um risco 13% menor de desenvolver periodontite que os sujeitos com volumes mais baixos. As radiografias de 137 desses sujeitos demonstraram que os fisicamente ativos tiveram menor perda óssea média comparados aos sedentários. Há uma associação inversa entre atividade física crônica e periodontite, independente de fatores de risco conhecidos. Ou seja, os benefícios de um estilo de vida fisicamente ativo podem se estender à saúde periodontal (MERCHANT et al., 2003).

O exercício físico regular é capaz de reduzir a suscetibilidade de um organismo à infecções através da melhora na resposta imunológica do hospedeiro (NIEMAN, 2011). Assim,

a atividade física possui efeitos benéficos sobre a periodontite, principalmente de forma preventiva. Além disso, o exercício crônico de intensidade moderada aumenta a concentração e secreção de Imunoglobulina A Secretora (SIgA) salivar (AKIMOTO et al., 2003; TROCHIMIAK; HÜBNER-WOŹNIAK, 2012). A SIgA protege a superfície da mucosa oral, prevenindo a aderência de bactérias e dificultando o aparecimento de infecções orais (HASAN; PALMER, 2014). Assim, a prática de exercício pode ser uma ação preventiva contra DP, podendo ser prescrita para grupos com predisposição ao desenvolvimento dessas condições (TELFORD; COULTER; MURRAY, 2011).

Estudos envolvendo exercício forçado (natação) e ratos induzidos à DP por ligadura, verificaram que o exercício foi capaz de reduzir comportamento ansioso, a expressão de proteínas inflamatórias e a reabsorção óssea alveolar (ANDRADE et al., 2018, 2017).

O estresse é um dos fatores associados à DP (DEINZER et al., 2007; GOYAL et al., 2013; HUGO et al., 2006; RAI et al., 2011; RENERS; BRECX, 2007) que também pode interferir de maneira prejudicial sobre o exercício físico (STULTS-KOLEHMAINEN; SINHA, 2014). Uma vez que a roda de atividade voluntária é um modelo animal que mimetiza os benefícios da atividade física em humanos e evita o estresse da manipulação dos animais pelos pesquisadores (SEO et al., 2014), seria possível verificar com menores interferências os efeitos de um fator sobre o outro.

3 JUSTIFICATIVA

Estudos que investiguem a atividade física como estratégias alternativas de controle não farmacológico para a DP, ainda são escassos na literatura. Estudos envolvendo atividade física voluntária e DP não foram relatados até o momento. Avaliar se a atividade voluntária é capaz de reduzir a progressão da DP e também a influência da DP sobre a propensão à atividade voluntária, podem gerar informações importantes sobre as relações fisiológicas entre inflamação local e comportamento.

4 OBJETIVO GERAL

Comparar os efeitos da atividade física voluntária sobre os parâmetros inflamatórios de camundongos com DP induzida por ligadura. Dessa forma, pretende-se verificar se a atividade física voluntária pode modular a reabsorção óssea alveolar induzida pela DP e também se a DP causa redução da predisposição à atividade física voluntária.

4.1 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar o ganho de peso dos animais, semanalmente.
- ✓ Realizar a avaliação morfométrica da reabsorção óssea alveolar (ROA) nas maxilas de todos os grupos.
- ✓ Determinar o volume total de atividade física voluntária realizada pelos animais com e sem DP nos períodos claro e escuro, pré e pós indução à DP.
- ✓ Determinar a velocidade média de atividade física voluntária realizada pelos animais nos períodos claro e escuro, pré e pós indução à DP para avaliação do padrão comportamental de atividade.
- ✓ Determinar a quantidade de horas inativas nos períodos claro e escuro, pré e pós indução à DP para avaliação do padrão comportamental.
- ✓ Verificar a influência da DP sobre a frequência e tempo de atividade física.
- ✓ Avaliar a resposta inflamatória local no tecido gengival por meio da expressão gênica do ligante do fator ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), Osteoprotegerina (OPG) e das citocinas interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α), pela técnica de PCR em tempo real.
- ✓ Verificar possíveis alterações na expressão dos genes: fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), glutamato descarboxilase (GAD65), orexina (HRCT) e hormônio concentrador de melanina (MCH) no hipotálamo pela técnica de PCR em tempo real.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Frente à importância da DP, tornam-se necessárias alternativas de controle e prevenção destas doenças. Nesse sentido, o exercício físico voluntário pode se tornar uma estratégia em potencial, devido ao seu baixo custo, variedade de benefícios a saúde geral e possibilidade de aplicação em grupos populacionais. Com este tipo de atividade física, o estresse da obrigatoriedade em realizar a tarefa é reduzido, e ainda é possível promover melhorias tanto metabólicas quanto imunológicas, contribuindo para o bem-estar e qualidade de vida. No estado atual do conhecimento, os efeitos do exercício físico voluntário sobre o desenvolvimento da DP ainda não foram elucidados.

6 REFERÊNCIAS

- ACHONG, R. et al. Membrane Type (MT)1-Matrix Metalloproteinase (MMP) and MMP-2 Expression in Ligature-Induced Periodontitis in the Rat. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 4, p. 494–500, abr. 2003.
- AKIMOTO, T. et al. Effects of 12 months of exercise training on salivary secretory IgA levels in elderly subjects. **British journal of sports medicine**, v. 37, n. 1, p. 76–9, fev. 2003.
- AL-ZAHRANI, M. S. Increased intake of dairy products is related to lower periodontitis prevalence. **Journal of periodontology**, v. 77, n. 2, p. 289–94, fev. 2006.
- AL-ZAHRANI, M. S.; BORAWSKI, E. A.; BISSADA, N. F. Periodontitis and three health-enhancing behaviors: maintaining normal weight, engaging in recommended level of exercise, and consuming a high-quality diet. **Journal of periodontology**, v. 76, n. 8, p. 1362–6, ago. 2005a.
- AL-ZAHRANI, M. S.; BORAWSKI, E. A.; BISSADA, N. F. Increased physical activity reduces prevalence of periodontitis. **Journal of dentistry**, v. 33, n. 9, p. 703–10, out. 2005b.
- ALLEN, J.; SUN, Y.; WOODS, J. A. Exercise and the Regulation of Inflammatory Responses. In: **Progress in molecular biology and translational science**. [s.l: s.n.]. v. 135p. 337–354.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. American Academy of Periodontology Task Force Report on the Update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions. **Journal of periodontology**, v. 86, n. 7, p. 835–8, jul. 2015.
- AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY. **Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols**. [s.l: s.n.].

AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION. Chapter 3. Exercise Protocols Using Rats and Mice. **Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols**, n. February, p. 53–56, 2007.

ANDRADE, E. et al. Physical Exercise Improves Glycemic and Inflammatory Profile and Attenuates Progression of Periodontitis in Diabetic Rats (HFD/STZ). **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1702, 7 nov. 2018.

ANDRADE, E. F. et al. Exercise attenuates alveolar bone loss and anxiety-like behaviour in rats with periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, n. 11, p. 1153–1163, nov. 2017.

AOYAMA, S.; SHIBATA, S. The Role of Circadian Rhythms in Muscular and Osseous Physiology and Their Regulation by Nutrition and Exercise. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, p. 63, 14 fev. 2017.

BAWADI, H. A. et al. The association between periodontal disease, physical activity and healthy diet among adults in Jordan. **Journal of Periodontal Research**, v. 46, n. 1, p. 74–81, fev. 2011.

BEAVERS, K. M.; BRINKLEY, T. E.; NICKLAS, B. J. Effect of exercise training on chronic inflammation. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 11–12, p. 785–793, 3 jun. 2010.

BERANGER, G. E. et al. In vitro brown and “brite”/“beige” adipogenesis: Human cellular models and molecular aspects. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 5, p. 905–914, 2013.

BEZERRA, M. M. et al. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 35, n. 5, p. 613–6, maio 2002.

BHERER, L.; ERICKSON, K. I.; LIU-AMBROSE, T. A Review of the Effects of Physical Activity and Exercise on Cognitive and Brain Functions in Older Adults. **Journal of Aging Research**, v. 8, 2013.

BOOTH, F. W. et al. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 2, p. 774–787, fev. 2000.

BRANCH-MAYS, G. L. et al. The Effects of a Calorie-Reduced Diet on Periodontal Inflammation and Disease in a Non-Human Primate Model. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 7, p. 1184–1191, jul. 2008.

CARDOSO, E. M.; REIS, C.; MANZANARES-CÉSPEDES, M. C. Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. **Postgraduate Medicine**, v. 130, n. 1, p. 98–104, 2 jan. 2018.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public health reports (Washington, D.C. : 1974)**, v. 100, n. 2, p. 126–31, 1985.

CASSILHAS, R. C. et al. Animal model for progressive resistance exercise: a detailed

- description of model and its implications for basic research in exercise. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 19, n. 1, p. 178–184, mar. 2013.
- CHEN, Y.-C. et al. The effects of altitude training on the AMPK-related glucose transport pathway in the red skeletal muscle of both lean and obese Zucker rats. **High altitude medicine & biology**, v. 12, n. 4, p. 371–8, 2011.
- CHIEFFI, S. et al. Exercise Influence on Hippocampal Function: Possible Involvement of Orexin-A. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 85, 14 fev. 2017.
- CHOLEWA, J. et al. Basic Models Modeling Resistance Training: An Update for Basic Scientists Interested in Study Skeletal Muscle Hypertrophy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 9, p. 1148–1156, set. 2014.
- CHUNG, W. O. et al. Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. 30, p. 3073–83, 2007.
- CLARK, D.; FEBBRAIO, M.; LEVIN, L. Aggressive periodontitis: The unsolved mystery. **Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)**, v. 48, n. 2, p. 103–111, 2017.
- COSTA, F. O. et al. Epidemiology of Periodontal Disease. **International Journal of Dentistry**, v. 2012, p. 1–2, 2012.
- CUETO, A. et al. Periodontitis as risk factor for acute myocardial infarction. A case control study of Spanish adults. **Journal of periodontal research**, v. 40, n. 1, p. 36–42, fev. 2005.
- DE BONO, J. P. et al. Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 4, p. R926–R934, abr. 2006.
- DE MOLON, R. S. et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 6, p. 1203–1216, 28 jul. 2016.
- DEINZER, R. et al. Comparison of experimental gingivitis with persistent gingivitis: differences in clinical parameters and cytokine concentrations. **Journal of periodontal research**, v. 42, n. 4, p. 318–24, ago. 2007.
- DEMMER, R. T. et al. Periodontal status and A1C change: longitudinal results from the study of health in Pomerania (SHIP). **Diabetes care**, v. 33, n. 5, p. 1037–43, maio 2010.
- DING, D. et al. The economic burden of physical inactivity: a global analysis of major non-communicable diseases. **The Lancet**, v. 388, n. 10051, p. 1311–1324, 24 set. 2016.
- DINIZ, G. B.; BITTENCOURT, J. C. The Melanin-Concentrating Hormone as an Integrative Peptide Driving Motivated Behaviors. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 11, p. 32, 29 maio 2017.
- DROSTE, S. K. et al. Voluntary Exercise Impacts on the Rat Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis Mainly at the Adrenal Level. **Neuroendocrinology**, v. 86, n. 1, p. 26–37, 2007.

- DUMITH, S. C. et al. Worldwide prevalence of physical inactivity and its association with human development index in 76 countries. **Preventive Medicine**, v. 53, n. 1–2, p. 24–28, jul. 2011.
- ECKEL-MAHAN, K.; SASSONE-CORSI, P. Phenotyping Circadian Rhythms in Mice. **Current protocols in mouse biology**, v. 5, n. 3, p. 271–81, 1 set. 2015.
- EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 162–184, 5 fev. 2013.
- EKE, P. I.; GENCO, R. J. CDC Periodontal Disease Surveillance Project: Background, Objectives, and Progress Report. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 7s, p. 1366–1371, jul. 2007.
- ELEY, B. M.; SOORY, M.; MANSON, J. D. **Periodontia**. [s.l.] Elsevier Health Sciences Brazil, 2012.
- FINE, D. H.; PATIL, A. G.; LOOS, B. G. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 89, p. S103–S119, jun. 2018.
- FOUREAUX, R. DE C. et al. Effects of Probiotic Therapy on Metabolic and Inflammatory Parameters of Rats With Ligature-Induced Periodontitis Associated With Restraint Stress. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 7, p. 975–983, jul. 2014.
- GARCIA DE AQUINO, S. et al. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. **Life Sciences**, v. 84, n. 21–22, p. 745–754, 22 maio 2009.
- GIELEN, S. et al. Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 42, n. 5, p. 861–8, 3 set. 2003.
- GOMES, M. S. et al. Can Apical Periodontitis Modify Systemic Levels of Inflammatory Markers? A Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 10, p. 1205–1217, out. 2013.
- GOYAL, S. et al. Stress and periodontal disease: The link and logic!! **Industrial psychiatry journal**, v. 22, n. 1, p. 4–11, jan. 2013.
- GRAVES, D. T. et al. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. **Frontiers of oral biology**, v. 15, p. 117–32, 2012.
- HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 463–469, 24 jul. 2008.
- HASAN, A.; PALMER, R. M. A clinical guide to periodontology: pathology of periodontal disease. **British dental journal**, v. 216, n. 8, p. 457–61, abr. 2014.
- HASKELL, W. L. et al. Physical Activity and Public Health. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 39, n. 8, p. 1423–1434, ago. 2007.
- HAYASHIDA, H. et al. Relationship between periodontal status and HbA1c in nondiabetics.

Journal of public health dentistry, v. 69, n. 3, p. 204–6, jan. 2009.

HE, W. et al. Point-of-Care Periodontitis Testing: Biomarkers, Current Technologies, and Perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1127–1144, nov. 2018.

HIGHFIELD, J. Diagnosis and classification of periodontal disease. **Australian Dental Journal**, v. 54, p. S11–S26, set. 2009.

HOLLANDER, J. et al. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 442, n. 3, p. 426–34, jun. 2001.

HOWER, I. M.; HARPER, S. A.; BUFORD, T. W. Circadian Rhythms, Exercise, and Cardiovascular Health. **Journal of Circadian Rhythms**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2018.

HOWLEY, E. T. Type of activity: resistance, aerobic and leisure versus occupational physical activity. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 33, n. 6 Suppl, p. S364- 9; discussion S419-20, jun. 2001.

HUGO, F. N. et al. Chronic stress, depression, and cortisol levels as risk indicators of elevated plaque and gingivitis levels in individuals aged 50 years and older. **Journal of periodontology**, v. 77, n. 6, p. 1008–14, jun. 2006.

ISLAM, S. A. et al. Association of periodontitis with insulin resistance, β -cell function, and impaired fasting glucose before onset of diabetes. **Endocrine journal**, v. 62, n. 11, p. 981–9, jan. 2015.

IWASAKI, M. et al. Longitudinal relationship of severe periodontitis with cognitive decline in older Japanese. **Journal of Periodontal Research**, p. n/a-n/a, jan. 2016.

JANG, J.-H. et al. Novel analgesic effects of melanin-concentrating hormone on persistent neuropathic and inflammatory pain in mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 707, 15 dez. 2018.

JIN, L. J. et al. Global oral health inequalities: task group--periodontal disease. **Advances in dental research**, v. 23, n. 2, p. 221–6, 13 maio 2011.

JONSDOTTIR, I. H. et al. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. **The Journal of physiology**, v. 528 Pt 1, p. 157–63, 1 out. 2000.

JÖNSSON, D. et al. Circulating endothelial progenitor cells in periodontitis. **Journal of periodontology**, v. 85, n. 12, p. 1739–47, dez. 2014.

JORDÃO, L. M. R. et al. Individual and contextual determinants of periodontal health in 12-year-old schoolchildren in a brazilian capital city. **International journal of dentistry**, v. 2012, p. 325475, 2012.

JOSHIPURA, K. Exercise, high-quality diet, and maintaining normal weight are associated with reduced levels of periodontitis. **Journal of Evidence Based Dental Practice**, v. 6, n. 3, p. 230–231, set. 2006.

KARNANI, M. M. et al. Lateral hypothalamic GAD65 neurons are spontaneously firing and

- distinct from orexin- and melanin-concentrating hormone neurons. **The Journal of Physiology**, v. 591, n. 4, p. 933–953, 15 fev. 2013.
- KAUR, G. et al. Periodontal Infectogenomics. **Inflammation and regeneration**, v. 38, p. 8, 2018.
- KE, Z. et al. The Effects of Voluntary, Involuntary, and Forced Exercises on Brain-Derived Neurotrophic Factor and Motor Function Recovery: A Rat Brain Ischemia Model. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16643, 8 fev. 2011.
- KELLER, M. et al. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 50, p. 21407–21412, 15 dez. 2009.
- KESANIEMI, Y. K. et al. Dose-response issues concerning physical activity and health: an evidence-based symposium. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 33, n. 6 Suppl, p. S351-8, jun. 2001.
- KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17038, 22 jun. 2017.
- KLAUSEN, B. Microbiological and Immunological Aspects of Experimental Periodontal Disease in Rats: A Review Article. **Journal of Periodontology**, v. 62, n. 1, p. 59–73, jan. 1991.
- KOHL, H. W. et al. The pandemic of physical inactivity: global action for public health. **The Lancet**, v. 380, n. 9838, p. 294–305, jul. 2012.
- KOSSE, C. et al. Orexin-driven GAD65 network of the lateral hypothalamus sets physical activity in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 17, p. 4525–4530, 25 abr. 2017.
- LEONARDO-MENDONÇA, R. C. et al. The benefits of four weeks of melatonin treatment on circadian patterns in resistance-trained athletes. **Chronobiology International**, v. 32, n. 8, p. 1125–1134, 14 set. 2015.
- LI, C. H.; AMAR, S. Morphometric, Histomorphometric, and Microcomputed Tomographic Analysis of Periodontal Inflammatory Lesions in a Murine Model. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 6, p. 1120–1128, jun. 2007.
- LIN, J. et al. Porphyromonas gingivalis Exacerbates Ligature-Induced, RANKL-Dependent Alveolar Bone Resorption via Differential Regulation of Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 10, p. 4127–4134, out. 2014.
- LIN, M. et al. Different engagement of TLR2 and TLR4 in Porphyromonas gingivalis vs. ligature-induced periodontal bone loss. **Brazilian oral research**, v. 31, p. e63, 21 ago. 2017.
- LISTGARTEN, M. A. Pathogenesis of periodontitis. **Journal of clinical periodontology**, v. 13, n. 5, p. 418–30, maio 1986.
- LISTGARTEN, M. A.; HELLDÉN, L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. **Journal of clinical periodontology**, v. 5, n. 2, p.

115–32, maio 1978.

LOCKER, D.; SLADE, G. D.; MURRAY, H. Epidemiology of periodontal disease among older adults: a review. **Periodontology** 2000, v. 16, n. 1, p. 16–33, fev. 1998.

MAHANONDA, R. et al. Human Memory B Cells in Healthy Gingiva, Gingivitis, and Periodontitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 197, n. 3, p. 715–25, 1 ago. 2016.

MERCHANT, A. T. et al. Increased physical activity decreases periodontitis risk in men. **European journal of epidemiology**, v. 18, n. 9, p. 891–8, jan. 2003.

MOLON, R. S. DE [UNESP]. Avaliação das alterações teciduais em diferentes modelos de indução de doença periodontal em camundongo. **Aleph**, p. 114 f. : il. color + anexo, 20 mar. 2012.

MOLTENI, R.; YING, Z.; GÓMEZ-PINILLA, F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. **The European journal of neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 1107–16, set. 2002.

MONTANDON, A. A. B.; ZUZA, E. P.; DE TOLEDO, B. E. C. Prevalence and Reasons for Tooth Loss in a Sample from a Dental Clinic in Brazil. **International Journal of Dentistry**, v. 2012, p. 1–5, 29 ago. 2012.

MORGAN, J. A.; CORRIGAN, F.; BAUNE, B. T. Effects of physical exercise on central nervous system functions: a review of brain region specific adaptations. **Journal of Molecular Psychiatry**, v. 3, n. 1, p. 3, 18 dez. 2015.

MOUTSOPOULOS, N. M.; MADIANOS, P. N. Low-grade inflammation in chronic infectious diseases: paradigm of periodontal infections. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1088, n. 1, p. 251–64, 1 nov. 2006.

MOYNIHAN, P. J. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 9, p. 694–9, set. 2005.

NATIONAL INSTITUTE OF DENTAL AND CRANIOFACIAL RESEARCH. Periodontal (Gum) Disease. **Periodontal (Gum) Disease**, p. 5, 2013.

NAZIR, M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. **International Journal of Health Sciences**, v. 1, n. 2, p. 72–80, 2017.

NELSON, M. E. et al. Physical Activity and Public Health in Older Adults. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 39, n. 8, p. 1435–1445, ago. 2007.

NEWMAN, M. G. et al. **Carranza Periodontia Clínica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2016.

NIEMAN, D. C. Moderate Exercise Improves Immunity and Decreases Illness Rates. **American Journal of Lifestyle Medicine**, v. 5, n. 4, p. 338–345, abr. 2011.

NIESS, A. M.; SIMON, P. Response and adaptation of skeletal muscle to exercise--the role of reactive oxygen species. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 12, p.

4826–38, 1 set. 2007.

NUNN, M. E. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. **Periodontology** 2000, v. 32, p. 11–23, 2003.

OLIVEIRA, J. A. P. et al. Periodontal Disease as a Risk Indicator for Poor Physical Fitness: A Cross-Sectional Observational Study. **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 1, p. 44–52, jan. 2015.

PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 34, n. 3, p. 235–49, mar. 1976.

PAPATHANASSOGLU, E. D. E.; MILTIADOUS, P.; KARANIKOLA, M. N. May BDNF Be Implicated in the Exercise-Mediated Regulation of Inflammation? Critical Review and Synthesis of Evidence. **Biological Research For Nursing**, v. 17, n. 5, p. 521–539, out. 2015.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1379–1406, 1 out. 2008.

PÉREZ-CHAPARRO, P. J. et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. **Journal of dental research**, v. 93, n. 9, p. 846–58, set. 2014.

PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. Strengthening the Prevention of Periodontal Disease: The WHO Approach. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 12, p. 2187–2193, dez. 2005.

PEYRON, C. et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 23, p. 9996–10015, 1 dez. 1998.

PORTO, A. N. et al. Effects of forced alcohol intake associated with chronic stress on the severity of periodontitis: an animal model study. **International journal of dentistry**, v. 2012, p. 465698, 2012.

PRATESI, A.; TARANTINI, F.; DI BARI, M. Skeletal muscle: an endocrine organ. **Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases**, v. 10, n. 1, p. 11–4, jan. 2013.

RAI, B. et al. Salivary Stress Markers, Stress, and Periodontitis: A Pilot Study. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 2, p. 287–292, fev. 2011.

RAITAPURO-MURRAY, T.; MOLLESON, T. I.; HUGHES, F. J. The prevalence of periodontal disease in a Romano-British population c. 200-400 AD. **British Dental Journal**, v. 217, n. 8, p. 459–466, 24 out. 2014.

RENERS, M.; BRECX, M. Stress and periodontal disease. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 5, n. 4, p. 199–204, nov. 2007.

ROVIN, S.; COSTICH, E. R.; GORDON, H. A. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. **Journal of periodontal research**, v. 1, n. 3, p. 193–204, 1966.

- SCHEELE, C.; NIELSEN, S.; PEDERSEN, B. K. ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 95–99, abr. 2009.
- SCHEIERMANN, C.; KUNISAKI, Y.; FRENETTE, P. S. Circadian control of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 190–198, 8 mar. 2013.
- SCHRODER, E. A. et al. The cardiomyocyte molecular clock regulates the circadian expression of *Kcnh2* and contributes to ventricular repolarization. **Heart rhythm**, v. 12, n. 6, p. 1306–14, jun. 2015.
- SEO, D. Y. et al. Humanized animal exercise model for clinical implication. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 466, n. 9, p. 1673–1687, 21 set. 2014.
- SILVA, V. DE O. et al. β -Glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) Reduce Glucose Levels and Attenuate Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats with Periodontal Disease. **PLoS one**, v. 10, n. 8, p. e0134742, 20 ago. 2015.
- SILVA, V. DE O. et al. Promising Effects of Beta-Glucans on Metabolism and on the Immune Responses: Review Article. **American Journal of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 62–72, 1 jan. 2017.
- SLEIMAN, S. F. et al. Exercise promotes the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) through the action of the ketone body β -hydroxybutyrate. **eLife**, v. 5, 2016.
- SPALJ, S. et al. Periodontal conditions and oral hygiene in rural population of post-war Vukovar region, Croatia in correlation to stress. **European journal of medical research**, v. 13, n. 3, p. 100–6, mar. 2008.
- STANFORD, T. W.; REES, T. D. Acquired immune suppression and other risk factors/indicators for periodontal disease progression. **Periodontology 2000**, v. 32, p. 118–35, 2003.
- STULTS-KOLEHMAINEN, M. A.; SINHA, R. The Effects of Stress on Physical Activity and Exercise. **Sports Medicine**, v. 44, n. 1, p. 81–121, 13 jan. 2014.
- SUSIN, C. et al. Tooth loss and associated risk indicators in an adult urban population from south Brazil. **Acta odontologica Scandinavica**, v. 63, n. 2, p. 85–93, abr. 2005.
- SUTCLIFFE, J. G.; DE LECEA, L. The hypocretins: Setting the arousal threshold. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 5, p. 339–348, 1 maio 2002.
- TAKEDA, Y. et al. Molar loss and powder diet leads to memory deficit and modifies the mRNA expression of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus of adult mice. **BMC neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 81, 2016.
- TAUBMAN, M. A.; KAWAI, T.; HAN, X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 34, n. 5, p. 367–369, maio 2007.
- TELFORD, C.; COULTER, I.; MURRAY, L. Exploring socioeconomic disparities in self-reported oral health among adolescents in california. **Journal of the American Dental**

Association (1939), v. 142, n. 1, p. 70–8, jan. 2011.

THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Glossary of Periodontal Terms. **Journal of Periodontology. Fourth edition**, v. 48, n. 57, 2001.

TROCHIMIAK, T.; HÜBNER-WOŹNIAK, E. Effect of exercise on the level of immunoglobulin a in saliva. **Biology of sport**, v. 29, n. 4, p. 255–61, dez. 2012.

TYML, K. et al. Voluntary running exercise protects against sepsis-induced early inflammatory and pro-coagulant responses in aged mice. **Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 210, 8 dez. 2017.

VILLABLANCA, P. A. et al. Nonexercise Activity Thermogenesis in Obesity Management. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 4, p. 509–519, abr. 2015.

WANG, Y.; WISLOFF, U.; KEMI, O. J. Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy. **Physiological research**, v. 59, n. 5, p. 633–44, 2010.

WHIDDON, B. B.; PALMITER, R. D. Ablation of Neurons Expressing Melanin-Concentrating Hormone (MCH) in Adult Mice Improves Glucose Tolerance Independent of MCH Signaling. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 5, p. 2009–2016, 30 jan. 2013.

WILLIE, J. T. et al. Abnormal response of melanin-concentrating hormone deficient mice to fasting: Hyperactivity and rapid eye movement sleep suppression. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 819–829, 28 out. 2008.

WOLFF, G.; ESSER, K. A. Scheduled Exercise Phase Shifts the Circadian Clock in Skeletal Muscle. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 44, n. 9, p. 1663–1670, set. 2012.

YAMANAKA, A. et al. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. **Neuron**, v. 38, n. 5, p. 701–13, 5 jun. 2003.

YAMANAKA, Y.; HONMA, S.; HONMA, K.-I. Daily exposure to a running wheel entrains circadian rhythms in mice in parallel with development of an increase in spontaneous movement prior to running-wheel access. **J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 305, 2013.

YAMAZAKI, K. et al. Effect of tooth loss on spatial memory and trkB-mRNA levels in rats. **Hippocampus**, v. 18, n. 6, p. 542–547, 1 jun. 2008.

YUAN, H. et al. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 11, p. 1029–1036, nov. 2011.

ZAWADZKA, M.; JAGODZIŃSKI, P. P. Exercise-induced epigenetic regulations in inflammatory related cells. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 15, n. 1, p. 63–70, 1 jan. 2017.

ZHANG, X. et al. Prevalence Profile of Oral Disease in Ancient Population. **The Open Anthropology Journal**, v. 3, p. 12–15, 2010.

ZHAO, Y. et al. Er:YAG laser versus scaling and root planing as alternative or adjuvant for

chronic periodontitis treatment: a systematic review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 41, n. 11, p. 1069–1079, nov. 2014.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

**ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA REDUZ A REABSORÇÃO ÓSSEA
ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS INDUZIDOS À DOENÇA PERIODONTAL POR
LIGADURA**

**Artigo redigido de acordo com as normas para submissão no periódico
*Physiology and Behavior.***

ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA REDUZ A REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS INDUZIDOS À DOENÇA PERIODONTAL POR LIGADURA

Natalia O. Moura¹, Gustavo J. S. Pereira², Viviam O. Silva³, Luciano J. Pereira^{3,*,†}, Rodrigo F. Moura^{3,*,†}

¹ Veterinary Medicine Graduate Program, Federal University of Lavras, UFLA – Lavras, Minas Gerais, Brazil; nataliaoliveiradmoura@gmail.com (N.O.M.);

² Health Sciences Graduate Program, Federal University of Lavras, UFLA – Lavras, Minas Gerais, Brazil; ggustavo_11@hotmail.com (G.J.S.P.);

³ Medicine Department, University Center Athens, UFLA - Paracatu, Minas Gerais, Brazil; vivian_osbio@yahoo.com.br (V.O.S.);

³ Health Sciences Department, Federal University of Lavras, UFLA – University campus – PV8; Mail Box 3037 – Zip Code 37200-000 - Lavras, Minas Gerais, Brazil; lucianopereiraufra@gmail.com (L.J.P.); mourafit@yahoo.com.br (R.F.M.).

*Correspondence: lucianopereiraufra@gmail.com; Tel.: +55 35 3829-5211. <https://orcid.org/0000-0002-0502-2554>

All authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD), an infectious process initiated by the presence of the dental biofilm, may present varying degrees of progression, including severe alveolar bone resorption and eventual tooth loss. Physically active individuals are less prone to PD when compared to sedentary individuals, due to the anti-inflammatory potential of physical activity. The present study investigated the relationship between the voluntary physical activity and the evolution of PD in mice, as well as the influence of PD on voluntary physical activity behavior. Thirty-two male C57BL6 isogenic mice, eight weeks old, maintained under standard conditions were distributed in four treatments: Control Group (C); Voluntary Physical Activity Group (VPA); Periodontal Disease Group (PD) and Periodontal Disease and Voluntary Physical Activity Group (PD/VPA). The animals of the VPA and PD/VPA groups had its voluntary activity in a free running wheel registered in an automated acquisition system for 30 days. On the 15th day the PD and PD/VPA groups received a nylon thread around the second maxillary molar for PD induction. On the 30th day of the experiment, all animals were anesthetized and euthanized for tissue collection. Local inflammatory response (cytokines), alveolar bone resorption and

hypothalamic expression of genes associated with locomotor behavior were analyzed by the real-time PCR technique. Bone resorption was also analyzed by morphometry. The voluntary physical activity pattern was analyzed by the total volume of voluntary physical activity (total laps) and average speed (laps/minute) in each period (light or dark). Total inactive hours were also calculated. The data were compared by Two-way ANOVA for comparison of means between groups in factorial model 2x2 (induced to PD or not, with access to the free running wheel or not), followed by Bonferroni *post hoc* test when necessary ($p < 0.05$). The analyzes were performed in the GraphPad Prism 5 statistical program. The groups with PD induction presented greater alveolar bone resorption (ABR), higher RANKL gene expression, and lower OPG in the gingival tissue than the other groups. However, the PD/VPA group presented increased gene expression of OPG in the gingival tissue. PD induction increased the expression of the inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α , but VPA modulated the expression of IL-1 β and TNF- α at levels similar to group C. After induction to PD, the PD/VPA group presented a reduction in mean velocity and total volume of laps, as well as a longer time of inactivity in both periods (nocturnal and diurnal) when compared to the AFV group. Gene expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) and melanin concentrating hormone (MCH) in the hypothalamus were higher in the PD and PD/VPA groups. The gene expression of orexin in the hypothalamus was higher in the exercised groups. Expression of glutamate decarboxylase (GAD65) was higher in the PD, VPA and PD/VPA groups. It is concluded that voluntary physical activity has protective effects against inflammation and ABR due to PD, and that PD reduces voluntary physical activity, probably via modulation of hypothalamic genes, especially MCH.

Keywords: Inflammation. Voluntary physical activity. Voluntary exercise. Periodontitis. Free running wheel. Hypothalamus. Locomotor behavior.

1 INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal (DP) é caracterizada por uma inflamação crônica iniciada pelo acúmulo de biofilme na superfície dentária, que pode acarretar destruição dos tecidos de suporte dos dentes (ANDRADE et al., 2018, 2017; KAUR et al., 2018; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; NUNN, 2003; PORTO et al., 2012; STANFORD; REES, 2003). A resposta local envolve a ativação de osteoclastos e consequente reabsorção óssea, podendo causar mobilidade e em casos mais severos até a perda dentária (HIGHFIELD, 2009). A presença dos micro-organismos e a consequente ativação da resposta imunológica do hospedeiro elevam os níveis de citocinas tanto no tecido periodontal como sistemicamente, causando a longo prazo, uma inflamação sistêmica de baixo grau (GOMES et al., 2013).

Estudos demonstram que a prática de atividade física pode modular a inflamação crônica (ALLEN; SUN; WOODS, 2015; BEAVERS; BRINKLEY; NICKLAS, 2010; HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008) e indivíduos fisicamente ativos apresentam menor propensão à DP que indivíduos sedentários (BAWADI et al., 2011). Modelos animais de atividade física podem ser forçados ou voluntários de diversos tipos e intensidades. O exercício é considerado como um fator estressante para o organismo e quando forçado, esse aspecto é acentuado. Uma vez que o estresse pode aumentar o risco de desenvolvimento da DP (DEINZER et al., 2007; GOYAL et al., 2013; HUGO et al., 2006; RAI et al., 2011; RENERS; BRECX, 2007) e pode interferir negativamente no exercício físico (STULTS-KOLEHMAINEN; SINHA, 2014), emerge a possibilidade de utilização de modelos de atividade física voluntária. A atividade física voluntária minimiza o estresse de manipulação dos animais pelos pesquisadores e mimetiza os efeitos benéficos da atividade física em humanos. Existem desvantagens como a dificuldade para controlar a intensidade e duração do exercício, porém, estudos envolvendo a atividade física voluntária e DP inexistem, mas possibilitam verificar com menores interferências os efeitos da DP sobre a atividade física voluntária e vice-versa (SEO et al., 2014).

Outro aspecto importante é a ação do hipotálamo mediando a atividade física, a inflamação e o comportamento locomotor. Algumas proteínas liberadas por neurônios

hipotalâmicos, como o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), a orexina (HRCT), GAD65 (glutamato descarboxilase 65) e MCH (hormônio concentrador de melanina), são capazes de influenciar a atividade física voluntária e a inflamação (KOSSE et al., 2017).

Tanto a atividade física quanto a inflamação podem induzir a produção de BDNF, que pode exercer efeitos pró e/ou anti-inflamatórios (PAPATHANASSOGLU; MILTIADOUS; KARANIKOLA, 2015). Os níveis de orexina também podem ser aumentados pelo exercício físico (CHIEFFI et al., 2017), sendo que os neurônios orexigênicos foram relacionados com maior excitação e locomoção (PEYRON et al., 1998; SUTCLIFFE; DE LECEA, 2002; YAMANAKA et al., 2003). A ativação da orexina sinaliza e ativa os neurônios GAD65 do hipotálamo lateral. O silenciamento genético de GAD65 deprime a locomoção voluntária enquanto a superexpressão de GAD65 promove uma hiperlocomoção (KOSSE et al., 2017). Por outro lado, o MCH foi relacionado à redução da locomoção e diminuição da termogênese (WHIDDON; PALMITER, 2013), podendo exercer também um papel analgésico, já que camundongos C57BL6 knockout para MCH apresentam menor limiar para dor, enquanto camundongos que receberam MCH intranasal aumentaram seu limiar para dor (JANG et al., 2018).

Uma vez que tanto a DP quanto a atividade física podem modular as respostas inflamatórias (OLIVEIRA et al., 2015; PRATESI; TARANTINI; DI BARI, 2013) e comportamentais (KOSSE et al., 2017), esse estudo teve como objetivo investigar as inter-relações entre as duas condições em modelo murino afim de elucidar os aspectos moleculares envolvidos.

2 METODOLOGIA

O presente projeto foi desenvolvido após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (CEUA/UFLA) (058/18) e seguiu as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.1 Animais

Foram utilizados 32 camundongos machos da linhagem isogênica C57BL6, com oito semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os animais foram mantidos no próprio biotério de origem, em sala separada, e alojados individualmente em gaiolas de polietileno, forradas com maravalha para absorção de urina e água, a temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, com umidade $45 \pm 15\%$ e luminosidade em ciclos claro/escuro de 12/12 horas. Todos os animais foram alimentados de acordo com os padrões preconizados com dieta regular para roedores (Nuvilab®) e água *ad libitum*.

Os camundongos foram divididos em quatro grupos com oito animais cada (n=8): controle (C), atividade física voluntária (AFV), doença periodontal (DP) e doença periodontal e atividade física voluntária (DP/AFV).

2.2 Delineamento Experimental

Inicialmente todos os animais passaram por um período de sete dias de aclimação à sala, gaiolas e pesquisadores. Em seguida todos foram expostos à roda de atividade livre em suas gaiolas por um período de dois dias, para estabelecer uma linha de base de atividade física voluntária. Após esse período, os animais foram então subdivididos em quatro grupos de acordo com o volume de atividade física realizado na linha de base, para garantir a similaridade entre os grupos treinados (Figura 1).

Após essa divisão, os animais dos grupos AFV e DP/AFV foram expostos à atividade física voluntária através de livre acesso às rodas de atividades instaladas e mantidas na própria gaiola durante todo o período experimental (30 dias) (Figura 1). No décimo quinto dia de experimento os animais dos grupos DP e DP/AFV foram induzidos à DP através de protocolo de ligadura conforme descrição abaixo (DE MOLON et al., 2016). Ao final do período experimental, todos os animais foram anestesiados (cloridrato de xilazina a 10 mg/kg e cloridrato de cetamina a 80 mg/kg via intraperitoneal) e eutanasiados por decaptação para a coleta dos tecidos: hipotálamo, maxila e tecido gengival (Figura 1).

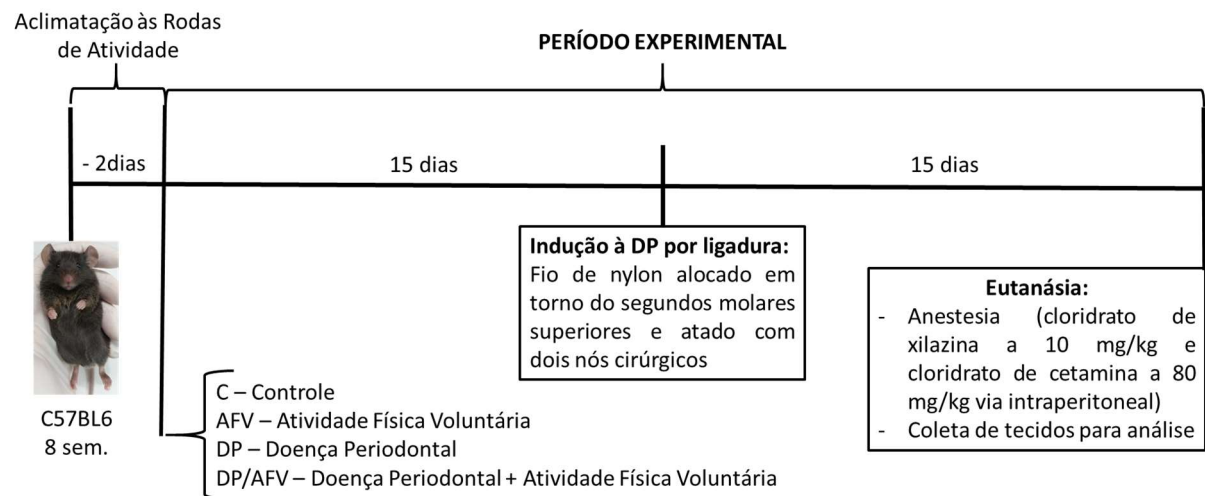


Figura 1. Delineamento experimental.

2.3 Atividade física voluntária

Os animais dos grupos AFV e DP/AFV tiveram acesso livre as rodas de atividade em suas gaiolas durante os 30 dias de experimento. As rodas são fabricadas em policarbonato com diâmetro externo de 10.16 cm, diâmetro interno de 9.2 cm e largura de 5 cm. Além disso, as rodas possuem um sensor de rotação conectado à uma interface de registro de rotações em computador através de um programa específico do fabricante (Columbus Instruments®, Columbus, Ohio).

Ao final do experimento, o volume total de atividade física voluntária no período, a velocidade média e o tempo de inatividade foram quantificados e estratificados dentro dos períodos claro e escuro para avaliação do padrão comportamental de atividade.

2.4 Indução à DP

No décimo quinto dia de experimento os animais dos grupos DP e DP/AFV foram anestesiados (cloridrato de xilazina a 10 mg/kg e cloridrato de cetamina a 80 mg/kg via intraperitoneal), e induzidos à DP através de ligadura (DE MOLON et al., 2016). Foi colocado um fio de nylon esterilizado de espessura 6.0 que foi alocado em torno do segundos molares

superiores (direito e esquerdo) e atado com nó cirúrgico (DE MOLON et al., 2016). Em todos os animais dos grupos DP e DP/AFV, a ligadura foi mantida em posição ao longo de todo o período experimental (até o 30º dia) sem a necessidade de substituição.

2.5 Coletas e Análises

O ganho de peso médio semanal foi calculado pela razão entre a diferença entre o peso final e inicial dos animais e o tempo de experimento (em dias). Ao final do período experimental, e após o procedimento de anestesia para eutanásia os animais tiveram sua massa corporal aferida individualmente. Os tecidos coletados foram as gengivas, maxilas e hipotálamo.

2.5.1 Análise Morfométrica da Reabsorção Óssea Alveolar (ROA)

Após a eutanásia, as maxilas foram removidas e separadas na linha média. As hemimaxilas direitas foram utilizadas para avaliação dos graus de reabsorção óssea alveolar (ROA) por meio de análise morfométrica. Para isso, elas foram fixadas em PBS formol (PBS - tampão fosfato), com o objetivo de manter a integridade dos tecidos após a morte, sem alteração da estrutura celular.

Em seguida as estruturas foram imersas em peróxido de hidrogênio por um período de 12 horas para facilitar a retirada dos tecidos moles remanescentes. Depois as peças foram coradas com azul de metileno 1% para demarcação da junção cimento-esmalte (NAPIMOGA et al., 2013).

Posteriormente, essas hemimaxilas foram posicionadas em lupa estereoscópica com uma câmera de vídeo acoplada a um computador de forma padronizada (sobreposição das cúspides vestibular e lingual, sem possibilidade de visualização da superfície oclusal). As imagens foram registradas com aumento de 37,5x e 56x e armazenadas para realização das medições lineares da distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) até a crista óssea alveolar (COA) utilizando a face vestibular conforme descrito por Oliveira et al. (2015). A ROA foi avaliada de forma cega por um examinador treinado. As medidas foram realizadas utilizando o

software Image J (Bethesda, MD, USA). A média de três medidas de cada animal foi utilizada para expressar a ROA.

2.5.2 Análises Moleculares – Extração de RNAm e PCR Tempo real

Os tecidos moles adjacentes à aplicação da ligadura foram removidos das maxilas para avaliação dos transcritos do RANKL (ligante do receptor do fator nuclear kapa B) e OPG (osteoprotegerina), além das citocinas IL-1 β (interleucina um beta), IL-6 (interleucina seis) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) que foram realizadas através da técnica de PCR em tempo real (*Polymerase Chain Reaction* quantitativo – expressão gênica relativa). Estas mesmas técnicas foram aplicadas para análise dos transcritos do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), glutamato descarboxilase 65 (GAD65), orexina (HRCT) e hormônio concentrador de melanina (MCH) no hipotálamo. As amostras foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C). Posteriormente foi realizado o procedimento de extração do RNAm, no qual as amostras foram homogeneizadas (Polytron PTA 20S Generator) em 500 μ l de solução Trizol (InVitrogen, São Paulo, Brasil) em máxima velocidade durante 30 segundos

Ao homogenato foi acrescentado 100 μ l de clorofórmio para posterior centrifugação a 10500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em novo recipiente ao qual foi adicionado isopropanol e misturado verticalmente. Essas amostras descansaram por cinco minutos em temperatura ambiente e depois foram centrifugadas a 10500rpm por 10 minutos. A parte líquida foi descartada e ao pellet restante foi adicionado 500 μ l de álcool 70%, armazenado previamente a -20°C. As amostras foram agitadas em vortex e depois centrifugadas a 8400rpm por 10 minutos. Novamente o líquido foi descartado e ao pellet restante foi adicionado 500 μ l de etanol 100%, armazenado previamente a -20°C. As amostras foram agitadas em vortex e depois centrifugadas a 8400rpm por cinco minutos. Em seguida o recipiente ficou aberto até a secagem do pellet e em seguida foi adicionado 20 μ l de água mili-q. As amostras foram novamente agitadas em vortex e armazenadas a -20°C. A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) e a

integridade do RNA foi verificada através da razão 260nm/280nm. A razão foi considerada boa entre 1,8 e 2,0.

A síntese de cDNA foi realizada com 2000ng de ácido nucleico, utilizando o kit comercial *Hight-Capacity DNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan TM® (Applied Biosystems, USA), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. O gene GAPDH (TaqManTM® – Applied Biosystems, USA; Mm.PT.39a.1) foi utilizado como controle endógeno da reação. Os valores relativos da expressão gênica dos transcritos associados com inflamação (IL-1 β (Mm00434228), IL-6 (Mm00446190) e TNF- α (Mm00443258)), marcadores de reabsorção óssea (RANKL (Mm.PT.58.29202697) e OPG (Mm.PT.58.41494681)) e genes hipotalâmicos relacionados à atividade voluntária (MCH (Mm01242886), HRCT (orexina) (Mm.PT.58.6815861), BDNF (Mm.PT.58.8157970) e GAD65 (Mm.PT.58.5262492)) foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems, USA).

2.5.3 Análise Estatística

Os dados foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA *two way*) para comparação entre os grupos estudados em modelo fatorial 2x2 (induzidos à DP ou não, com acesso à AFV ou não). Quando valores de F indicaram diferença significativa nas interações ($p < 0,05$), foi aplicado o *post hoc* de Bonferroni. As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.

3 RESULTADOS

A massa corporal dos animais foi aferida semanalmente e os resultados não revelaram diferença entre os grupos no início do experimento ($p > 0,05$). Porém, houve maior ganho de massa nos grupos AFV e DP/AFV ao longo dos 30 dias do período experimental ($p < 0,01$) (Figura 2).

Ganho de Massa Corporal

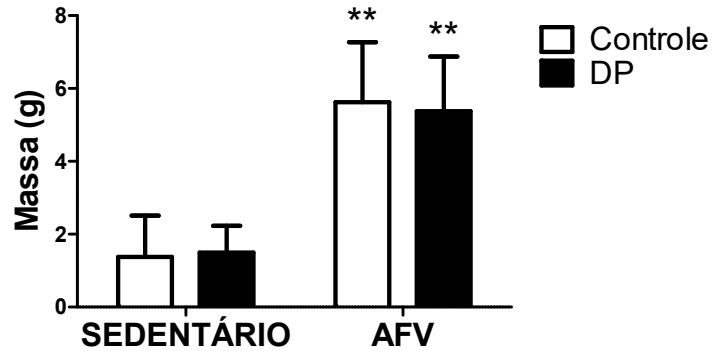


Figura 2. Ganho de massa corporal durante o período experimental. ** indica diferença em comparação com os grupos C e DP ($p < 0,01$). AFV – Atividade física voluntária, DP – Doença Periodontal.

A análise morfométrica demonstrou que a DP foi induzida nos grupos DP e DP/AFV. Houve maior ROA no grupo DP quando comparado a todos os outros grupos ($p < 0,05$). O grupo DP/AFV apresentou maior ROA que AFV ($P < 0,05$), mas não diferiu de C ($p > 0,05$) (Figura 3).

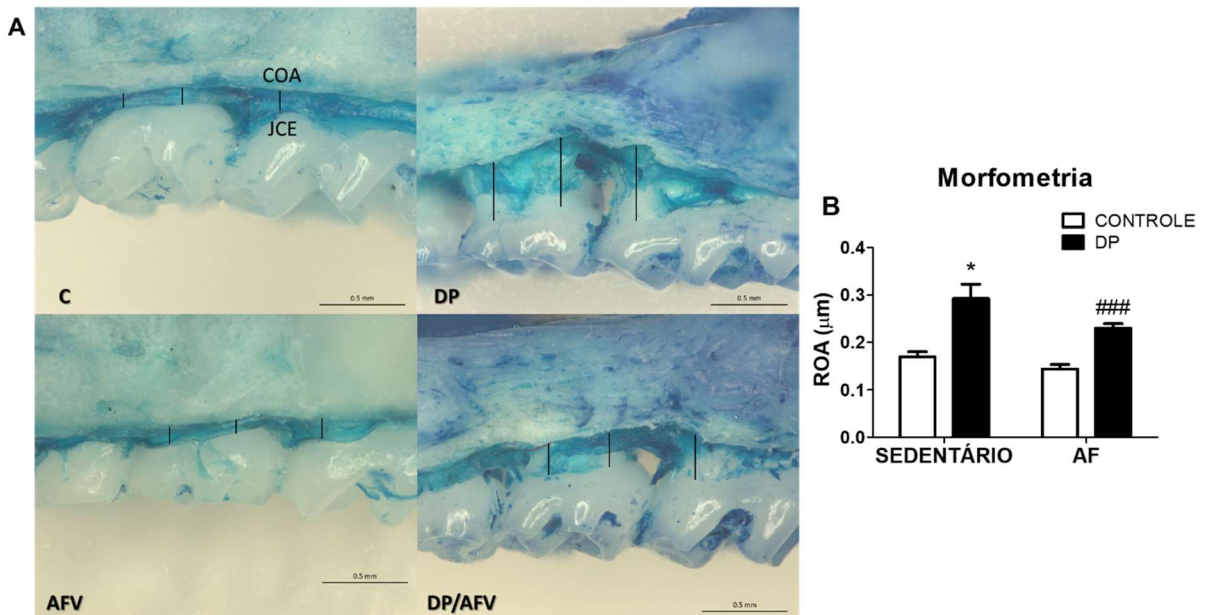


Figura 3. Análise de reabsorção óssea alveolar (ROA) através de morfometria. A – Maxilas em aumento de 56x. C – Controle, AFV – Atividade física voluntária, DP – Doença Periodontal, DP/AFV – Doença periodontal e Atividade Física Voluntária; JCE – Junção cimento esmalte, COA – Crista óssea alveolar. B – Representação estatística ROA. *diferença em relação aos outros grupos ($p < 0,05$); ### diferença em relação ao grupo AFV ($p < 0,001$).

A expressão gênica de RANKL e IL-6 foi maior nos grupos DP e DP/AFV ($p < 0,05$), indicando a presença de processo inflamatório no tecido gengival. Os grupos AFV e DP/AFV apresentaram níveis mais altos de OPG e mais baixos de TNF- α ($p < 0,05$). O grupo DP apresentou maior concentração de IL-1 β ($p < 0,01$) porém foi menor no grupo AFV ($p < 0,05$). O grupo DP/AFV apresentou diferença na concentração de IL-1 β somente em comparação ao grupo AFV ($p < 0,05$) (Figura 4).

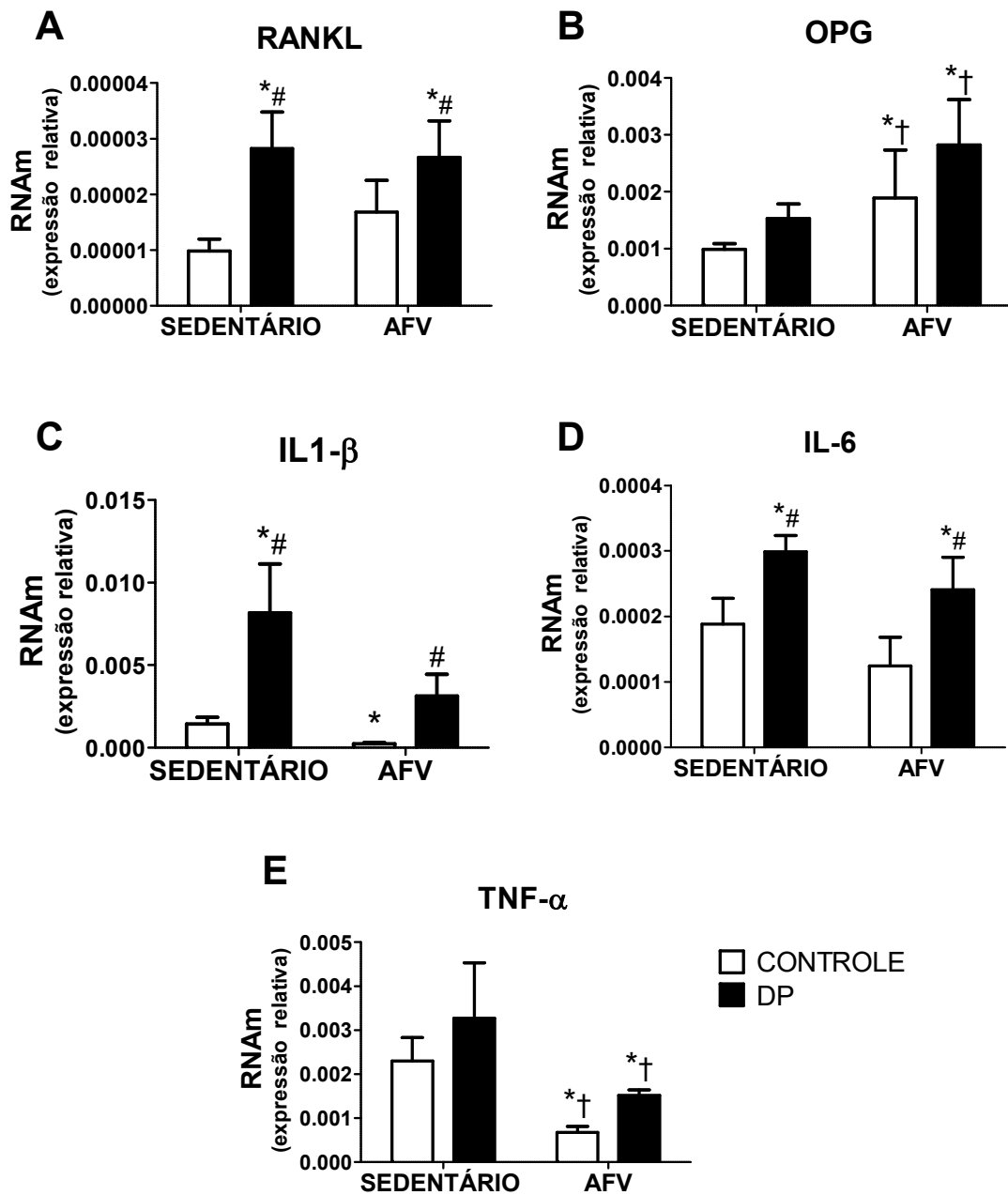


Figura 4. Expressão gênica de marcadores inflamatórios no tecido gengival. **A** – Expressão genica de RANKL. **B** - Expressão do RNAm da OPG. **C** - Interleucina 1 beta (IL-1 β). **D** – Interleucina 6 (IL-6). **E** – Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). *diferença em relação ao grupo C ($p < 0,05$); #diferença em relação ao grupo C ($p < 0,05$); †diferença em relação ao grupo DP ($p < 0,05$).

A análise do volume total de atividade física voluntária demonstrou que no período anterior à indução da DP não havia diferença estatística entre os grupos, porém após a indução

o grupo DP/AFV apresentou uma redução significativa durante sete dias ($p < 0,05$). O volume de atividade física voluntária foi retomado a partir do 22º dia de experimento ($p > 0,05$) (Figura 5).

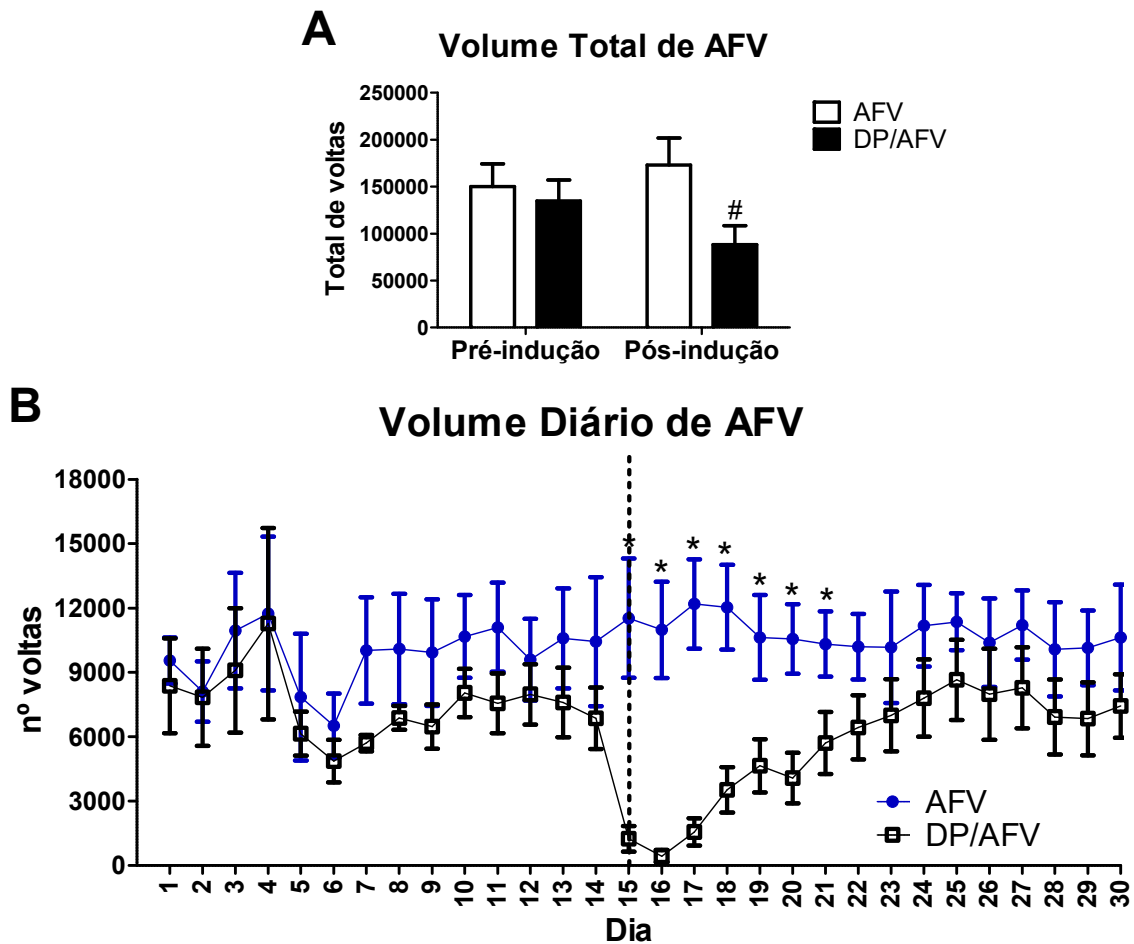


Figura 5. Volume total de atividade física voluntária. **A** - Volume total de atividade física antes e após a indução de DP. **B** - Volume diário de atividade física voluntária durante todo o período experimental. Linha tracejada - dia da indução à DP. #diferença quando comparado ao grupo AFV e DP/AFV no período pré-indução ($p < 0,05$); *diferença entre os grupos ($p < 0,05$).

O volume total de atividade voluntária também foi verificado de acordo com o período do dia. O grupo DP/AFV apresentou redução de atividade após a indução no período noturno, durante seis dias ($p < 0,05$). Por outro lado, no período diurno, essa redução se manteve até o final do experimento ($p < 0,01$) (Figura 6).

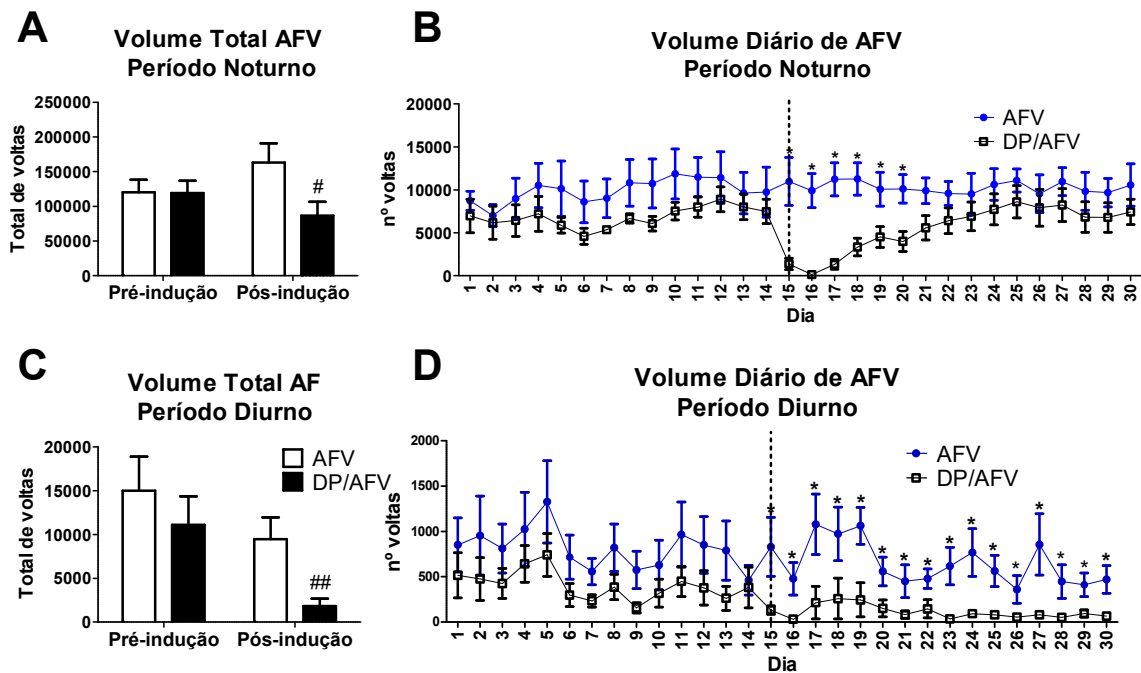


Figura 6. Volume total de atividade física por período. **A** – Volume de AFV no Período Noturno. **B** – Volume diário de AFV Período Noturno. **C** – Volume de AFV no Período Diurno. **D** – Volume diário de AFV Período Diurno. Linha tracejada – dia da indução à DP. *diferença entre os grupos ($p < 0,05$); #diferença quando comparado ao grupo AFV e DP/AFV no período pré-indução ($p < 0,05$); ##($p < 0,01$).

No período anterior à indução da DP não havia diferenças entre os grupos na velocidade média nas rodas de atividade livre ($p > 0,05$). Após a indução, ambos os grupos apresentaram redução deste parâmetro ($p < 0,001$), com maior magnitude no grupo DP/AFV do 15º dia (indução à DP) até o 19º dia. No período noturno essa redução durou seis dias e no período diurno, se manteve até o final do experimento ($p < 0,05$) (Figura 7).

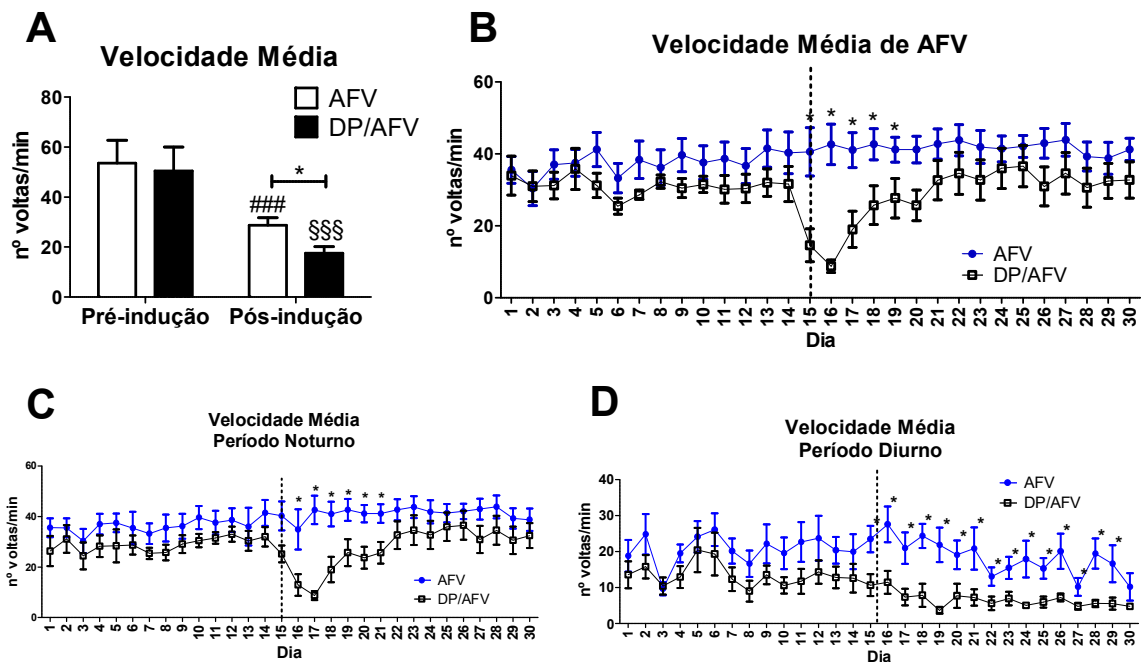


Figura 7. Velocidade média de atividade física voluntária. **A** – Velocidade média pré e pós indução à DP. **B** – Velocidade Média diária. **C** – Velocidade Média Diária no Período Noturno. **D** – Velocidade Média Diária no Período Diurno. Linha tracejada – dia da indução à DP. *diferença entre os grupos ($p < 0,05$); ###diferença quando comparado ao grupo AFV no período pré-indução ($p < 0,001$); \$\$\$diferença quando comparado ao grupo DP/AFV no período pré-indução ($p < 0,001$).

Anteriormente à indução à DP ambos os grupos apresentavam tempo de inatividade semelhante ($p > 0,05$). Após a indução os dois grupos passaram a apresentar maior tempo sem registro de atividade física voluntária, porém com aumento significativo no grupo DP/AFV ($p < 0,01$). A análise diária demonstrou que, a partir da indução, os animais do grupo DP/AFV aumentaram o tempo de inatividade no período noturno por quatro dias (do 15º ao 18º dia, $p < 0,05$) e no período diurno por oito dias (do 15º ao 22º dia, $p < 0,05$) (Figura 8).

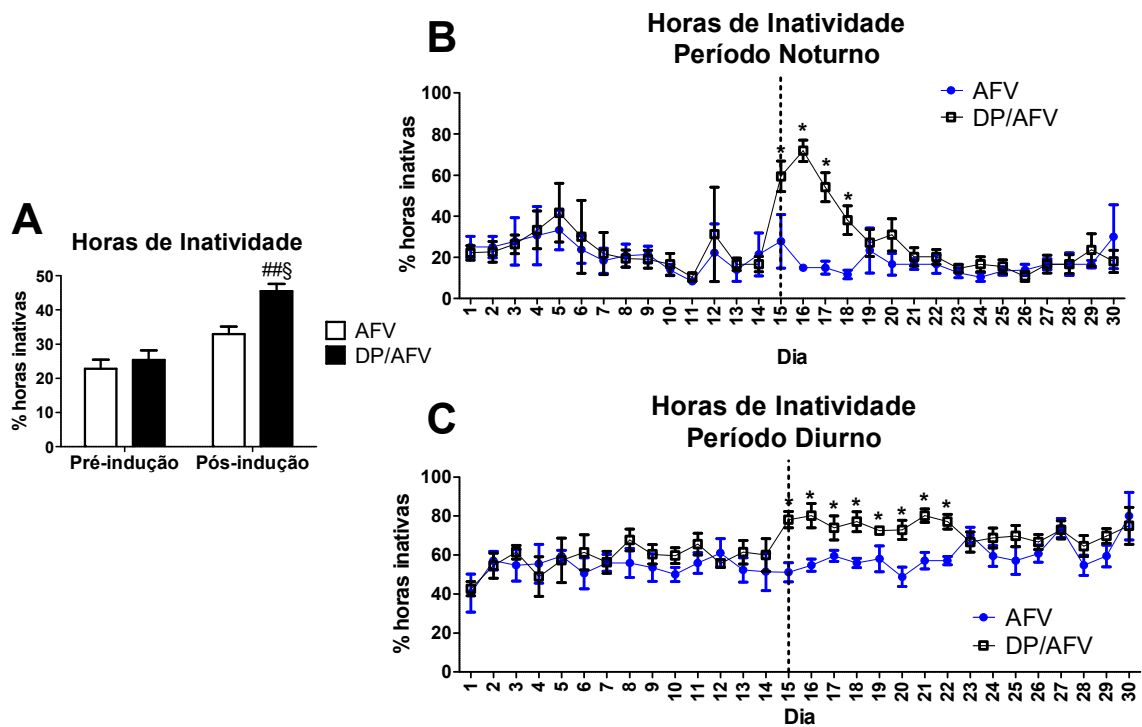


Figura 8. Horas de inatividade. **A** – Horas de inatividade antes e após a indução à DP. **B** – Porcentagem de horas inativas no período noturno. **C** – Porcentagem de horas inativas no período Diurno. Linha tracejada – dia da indução à DP. ^{##}diferença quando comparado ao grupo AFV ($p < 0,01$); [§]diferença quando comparado ao grupo DP/AFV no período pós-indução ($p < 0,05$).

As análises de expressão gênica do tecido hipotalâmico indicaram que os grupos DP e DP/AFV apresentaram maiores concentrações de BDNF e MCH que os outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 9). Além disso, os grupos AFV e DP/AFV apresentaram maiores concentrações de orexina que os grupos C e DP ($p < 0,05$). Adicionalmente, tanto a atividade física voluntária quanto a DP aumentaram as concentrações hipotalâmicas de ácido glutâmico descarboxilase (GAD65) ($p < 0,01$) (Figura 9).

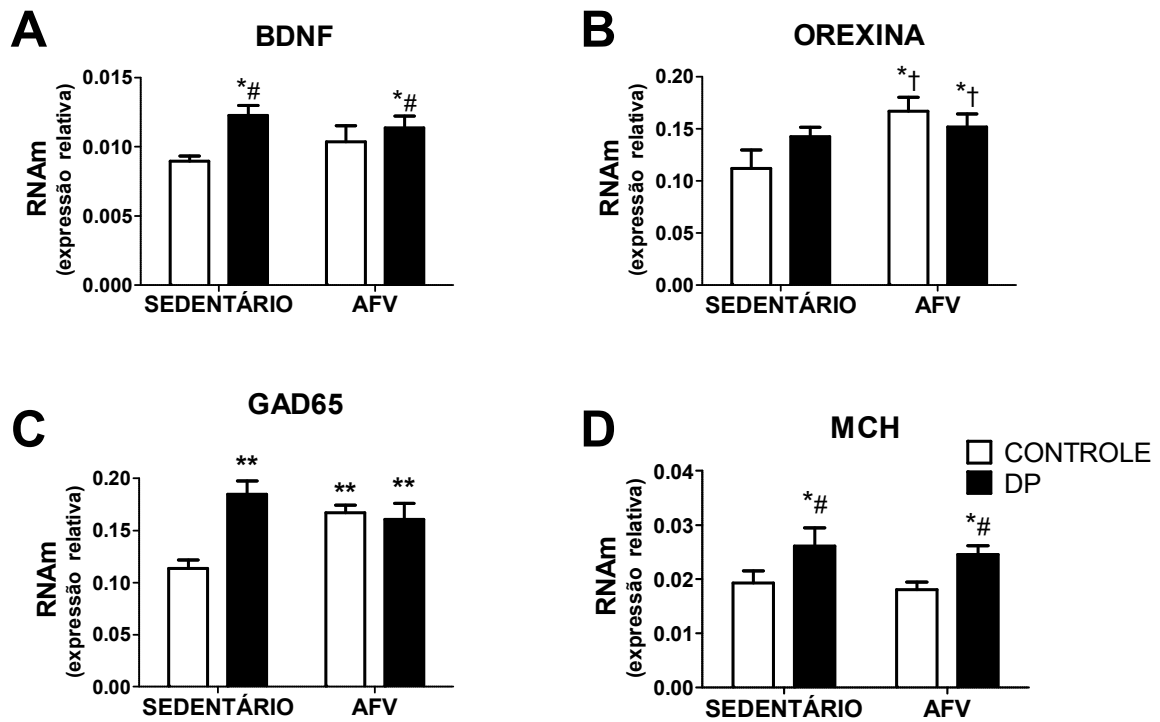


Figura 9. Análise da expressão gênica no hipotálamo. **A** – BDNF (Fator neurotrófico derivado do cérebro). **B** – Orexina (HRCT). **C** – Ácido glutâmico descarboxilase (GAD65). **D** – Hormônio concentrador de melanina (MCH). *diferença estatística comparado ao grupo C; ($p < 0,05$); **($p < 0,01$); #diferença comparado ao grupo AFV ($p < 0,05$); †diferença estatística comparado ao grupo DP ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo teve duração de 30 dias, e esse período revelou maior ganho de massa corporal entre os animais dos grupos exercitados. Alterações na composição corporal de ratos podem estar associadas a mudanças no nível de atividade física, idade, sexo e dieta (PITTS, 1984). Assim, as diferenças entre a massa corporal de camundongos sedentários e com acesso à roda de atividade voluntária eram esperadas devido à redução na gordura corporal e aumento da massa muscular dos animais ativos. Um estudo da década de 80 verificou que um grupo com acesso as rodas de atividade livre apresentou menor quantidade de gordura corporal e maior peso do músculo sóleo que o grupo controle, sendo o sóleo uma das musculaturas primárias na roda de atividade e por isso sujeito a hipertrofia (TOKUYAMA; SAITO; OKUDA, 1982).

A análise morfométrica confirmou a indução à DP, uma vez que os grupos DP e DP/AFV apresentaram maior ROA corroborando estudos anteriores com o mesmo período de indução (15 dias) (ANDRADE et al., 2018, 2017; GARCIA DE AQUINO et al., 2009; LIN et al., 2017).

Um estudo prévio verificou que o modelo de indução à DP por ligadura foi capaz de exibir ROA significativa em curto período de tempo (sete dias). Esses autores descrevem ainda que a ROA foi mantida ao longo do período experimental, diferindo de outros modelos como gavagem oral com bactérias ou injeção de *Pg heat-killed* na mucosa palatal entre os molares (DE MOLON et al., 2014).

O modelo de ligadura já apresenta infiltrado celular em poucos dias (5º dia após a indução), com pico inflamatório no 15º dia, e redução significativa no 30º dia (GARCIA DE AQUINO et al., 2009). Assim, no presente estudo optou-se pela permanência da ligadura por 15 dias para que a avaliação fosse realizada no pico de inflamação (DE MOLON et al., 2014; GARCIA DE AQUINO et al., 2009).

No presente estudo, o grupo DP obteve a maior ROA e o grupo DP/AFV apresentou valores similares ao grupo C, indicando caráter protetor da AFV contra a instalação da doença, amenizando seus efeitos e reduzindo a intensidade de reabsorção óssea. Resultados semelhantes foram verificados em estudos realizados com ratos Wistar induzidos à DP por meio de ligadura após oito semanas de treino de natação (ANDRADE et al., 2018, 2017; ANDRADE, 2016). Mesmo sem o controle da intensidade e duração, a atividade física voluntária na roda de corrida livre foi capaz de gerar os mesmos efeitos verificados no exercício forçado de natação, com a vantagem da redução de estresse de manipulação dos animais.

As análises da expressão gênica de marcadores de ROA no tecido gengival também confirmaram a DP, corroborando os resultados morfométricos. Os grupos DP e DP/AFV apresentaram maior expressão de RANKL no tecido gengival corroborando estudos prévios (ANDRADE et al., 2017; DE MOLON et al., 2016; FOUREAUX et al., 2014). Já a expressão gênica de OPG foi maior nos grupos com acesso as rodas de atividade livre. Embora os mecanismos pelos quais a DP causa ROA já tenham sido elucidados (NEWMAN et al., 2016; TAUBMAN; KAWAI; HAN, 2007), os mecanismos que causam aumento de OPG pós

exercício ainda não são claros. Em humanos, foram relatados níveis séricos elevados de OPG e reduzidos de RANKL imediatamente após corridas de longa distância, os autores descrevem uma relação dependente do tempo de atividade de *endurance* (ZIEGLER et al., 2005).

O exercício aumenta os níveis do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) séricos (CONNOLLY et al., 2004; CZARKOWSKA-PACZEK; BARTLOMIEJCZYK; PRZYBYLSKI, 2006; HEINEMEIER; LANGBERG; KJAER, 2003). Essas proteínas são precursoras na cascata de eventos que culminam com a produção de osteoblastos e conseqüentemente OPG, mantendo a formação óssea (CZARKOWSKA-PACZEK; BARTLOMIEJCZYK; PRZYBYLSKI, 2006). O aumento nos níveis de OPG promovido pelo treinamento pode levar a uma diminuição da interação entre RANKL e seu receptor, com conseqüente inativação dos osteoclastos resultando em uma redução da reabsorção óssea (ZIEGLER et al., 2005), conforme verificado no presente estudo, caracterizando efeitos benéficos da atividade física voluntária sobre os efeitos deletérios da DP.

Além da RANKL, a DP aumentou a expressão gênica de IL-6, IL-1 β e TNF- α , corroborando outros estudos (ANDRADE et al., 2017; DE MOLON et al., 2014, 2016; FOUREAUX et al., 2014). Por outro lado, a atividade física atenuou a expressão de IL-1 β e TNF- α . A diminuição de marcadores inflamatórios se assemelham aos observados em camundongos C57BL6 treinados em roda de atividade livre por 10 semanas e submetidos à uma inflamação hepática induzida por sepse aguda (PEPPLER et al., 2016). Também foi descrito diminuição de proteínas inflamatórias em ratos Wistar induzidos à DP e submetidos ao exercício forçado de natação durante oito semanas (ANDRADE et al., 2017).

A DP e a atividade física elevam os níveis de IL-6 (ALLEN; SUN; WOODS, 2015; ANDRADE et al., 2017; DE MOLON et al., 2016; PETERSEN; PEDERSEN, 2005) e esta, quando liberada pelos músculos na circulação causa subsequente aumento das citocinas anti-inflamatórias circulantes, IL-10 e IL-1RA, que antagonizam as ações da IL-1 β e TNF- α (ALLEN; SUN; WOODS, 2015; PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Possivelmente os efeitos anti-inflamatórios da atividade física voluntária impediram o aumento na expressão gênica de IL-1 β e TNF- α que em geral são expressos pela inflamação da DP.

No presente estudo, o volume total de atividade física do grupo AFV indicou que os animais tendem a manter uma certa quantidade diária e um platô de atividade voluntária nas rodas, conforme descrevem alguns estudos (HÄGER et al., 2018; TOKUYAMA; SAITO; OKUDA, 1982).

Por outro lado, a inflamação pode afetar negativamente as atividades motoras (COBOS et al., 2012), como verificado no grupo DP/AFV, que apresentou redução na velocidade média e volume total de corrida voluntária por no mínimo cinco dias, sendo pelo menos cinco dias no período noturno e aproximadamente 15 dias no período diurno. Pode-se especular que esses resultados, especialmente as alterações no comportamento diurno, sejam decorrentes de alterações no ciclo circadiano provocadas pelas citocinas pró-inflamatórias (KIZAKI et al., 2015; SCHEIERMANN; KUNISAKI; FRENETTE, 2013) causadas pela DP. Proteínas codificadas por genes do ciclo circadiano parecem estar envolvidas no desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas podendo inclusive aumentar a gravidade de seus sintomas (KIZAKI et al., 2015).

Até o momento, não foram encontrados estudos que investigaram os efeitos da inflamação gerada pela DP sobre a atividade física voluntária, mas a inflamação, independentemente de sua forma, reduz o comportamento voluntário nas rodas de atividade, mesmo que de maneira transitória (COBOS et al., 2012; HÄGER et al., 2018). Essa redução no volume de atividade e velocidade média nos primeiros dias após a indução é coincidente com o período no qual é relatada maior ROA em animais induzidos à DP (DE MOLON et al., 2014; GARCIA DE AQUINO et al., 2009).

No presente trabalho, houve redução na velocidade dos dois grupos exercitados (AFV e DP/AFV) nos 15 dias subsequentes à indução. O grupo AFV reduziu a velocidade, mas não o volume total de atividade física, diferentemente do grupo DP/AFV que apresentou redução em ambas variáveis. É possível que esses comportamentos do grupo DP/AFV sejam devidos à menor atividade diurna dos camundongos, associada à redução de atividade causada pela DP. Assim, o grupo AFV pode ter reduzido sua velocidade após o 15º dia de experimento, mas compensou o volume total com maior tempo de atividade nas rodas. Já foi verificado que

camundongos C57BL6 compensam velocidade e volume de atividade física voluntária de acordo com o tempo de exposição à roda livre (ROBISON et al., 2018).

No presente estudo não houve alteração na expressão gênica de BDNF no hipotálamo dos grupos AFV e C, mas sim um aumento de expressão desta proteína nos grupos induzidos à DP. Aumentos na expressão de BDNF podem ser induzidos pela inflamação e pela ativação neurossensorial relacionada a citocinas inflamatórias (PAPATHANASSOGLU; MILTIADOUS; KARANIKOLA, 2015), desta forma, acredita-se que o aumento de BDNF nesses grupos esteja relacionado à inflamação decorrente da DP. A inflamação periodontal aumentou os níveis hipotalâmicos de BDNF, mas o exercício voluntário realizado durante 30 dias não foi capaz alterar este parâmetro no hipotálamo, como já observado no hipocampo após exercício forçado ou voluntário por 42 dias (UYSAL et al., 2015).

O BDNF também aumenta a excitabilidade neuronal e contribui para a hiperalgesia (TAKEDA; TAKAHASHI; MATSUMOTO, 2014), podendo ser mediado por citocinas inflamatórias como o TNF- α (CHIMIENTI et al., 2012; SCHULTE-HERBRÜGGEN et al., 2005). Sugere-se ainda que o BDNF pode ser modulado pela perda dentária (TAKEDA et al., 2016; YAMAZAKI et al., 2008). Uma vez que o BDNF pode ter ações pró ou anti-inflamatórias (PAPATHANASSOGLU; MILTIADOUS; KARANIKOLA, 2015), é possível que o aumento de BDNF frente à inflamação possa ser uma medida protetora contra o comprometimento dental ou a inflamação provocada pela DP.

Além do BDNF, outros fatores estão relacionados aos efeitos cognitivos e comportamentais da atividade física. No presente experimento, os animais com acesso à roda de atividade voluntária apresentaram maior expressão gênica de orexina e de GAD65 no hipotálamo. Geralmente a orexina encontra-se aumentada após o exercício (MESSINA et al., 2016; PEREZ-LEIGHTON et al., 2017), ativando os neurônios GAD65 no hipotálamo lateral e ambas as proteínas regulam a atividade locomotora. O silenciamento genético de GAD65 deprime a locomoção voluntária enquanto sua superexpressão provoca hiperatividade em camundongos (KOSSE et al., 2017).

No presente estudo, a expressão genica de GAD65 no hipotálamo foi menor no grupo C em comparação a todos os outros grupos, mostrando uma modulação decorrente da atividade

física, mas também da inflamação. Uma vez que houve diferença no volume e velocidade de atividade física voluntária entre os grupos AFV e DP/AFV, o aumento na expressão de GAD65 não é suficiente para explicar a diferença no padrão de comportamento dos grupos. Porém, isso pode ser elucidado pela maior expressão de MCH hipotalâmico nos grupos induzidos à DP, já que esta proteína é associada à redução da atividade locomotora (DINIZ; BITTENCOURT, 2017; JANG et al., 2018). Além disso, a DP poderia promover o aumento de MCH devido a suas funções analgésicas (JANG et al., 2018). Dessa forma, os grupos DP e DP/AFV do presente estudo podem ter apresentado maior expressão gênica de MCH para regular a inflamação e possíveis efeitos dolorosos, em paralelo, a redução de atividade locomotora no grupo DP/AFV pode ser decorrente desse aumento.

A maior inatividade do grupo DP/AFV nas rodas por quatro dias no período noturno, e por oito dias no período diurno, subsequentes à indução também pode estar associado à maior expressão de MCH nos grupos induzidos à DP. Esses períodos de maior inatividade coincidem com o período de pico na expressão de marcadores inflamatórios nos primeiros sete dias após a indução (DE MOLON et al., 2014, 2016). Devido às suas funções antitermogênicas e de redução da locomoção, o MCH é entendido como um fator que visa diminuir o gasto energético, e talvez seja uma estratégia metabólica para direcionar recursos aos esforços sistêmicos e locais de resolução da inflamação (DINIZ; BITTENCOURT, 2017).

5 CONCLUSÃO

A atividade física voluntária apresentou efeitos protetores contra a inflamação gengival e reabsorção óssea alveolar. Ainda, a doença periodontal reduziu a atividade física voluntária especialmente nos dias de pico inflamatório, envolvendo a modulação de transcritos hipotalâmicos, especialmente o aumento de MCH.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG), National

Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) and Obesity and Comorbidities Research Center - OCRC for the support provided.

FORMATTING OF FUNDING SOURCES

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CONFLICTS OF INTEREST: The authors declare no conflict of interest.

HIGHLIGHTS

A Atividade física voluntária reduziu a reabsorção óssea alveolar e o perfil inflamatório gengival em camundongos induzidos à periodontite por ligadura.

A doença periodontal diminuiu o volume e a velocidade da atividade física voluntária, especialmente nos dias de pico inflamatório.

A atividade física voluntária e a DP modulam de forma antagônica a expressão de proteínas hipotalâmicas envolvidas na memória, aprendizado e de controle do balanço energético.

REFERÊNCIAS

ALLEN, J.; SUN, Y.; WOODS, J. A. Exercise and the Regulation of Inflammatory Responses. In: **Progress in molecular biology and translational science**. [s.l: s.n.]. v. 135p. 337–354.

ANDRADE, E. et al. Physical Exercise Improves Glycemic and Inflammatory Profile and Attenuates Progression of Periodontitis in Diabetic Rats (HFD/STZ). **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1702, 7 nov. 2018.

ANDRADE, E. F. **EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS INFLAMATÓRIAS EM RATOS COM DOENÇA PERIODONTAL, DIABÉTICOS OU NÃO**. [s.l: s.n.].

ANDRADE, E. F. et al. Exercise attenuates alveolar bone loss and anxiety-like behaviour in rats with periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, n. 11, p. 1153–1163, nov.

2017.

BAWADI, H. A. et al. The association between periodontal disease, physical activity and healthy diet among adults in Jordan. **Journal of Periodontal Research**, v. 46, n. 1, p. 74–81, fev. 2011.

BEAVERS, K. M.; BRINKLEY, T. E.; NICKLAS, B. J. Effect of exercise training on chronic inflammation. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 11–12, p. 785–793, 3 jun. 2010.

CHIEFFI, S. et al. Exercise Influence on Hippocampal Function: Possible Involvement of Orexin-A. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 85, 14 fev. 2017.

CHIMIANTI, G. et al. Plasma concentrations but not serum concentrations of brain-derived neurotrophic factor are related to pro-inflammatory cytokines in patients undergoing major abdominal surgery. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 631–636, jun. 2012.

COBOS, E. J. et al. Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: A nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. **Pain**, v. 153, n. 4, p. 876–884, abr. 2012.

CONNOLLY, P. H. et al. Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 4, p. 1461–1469, out. 2004.

CZARKOWSKA-PACZEK, B.; BARTLOMIEJCZYK, I.; PRZYBYLSKI, J. **THE SERUM LEVELS OF GROWTH FACTORS: PDGF, TGF-BETA AND VEGF ARE INCREASED AFTER STRENUOUS PHYSICAL EXERCISE**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.jpp.krakow.pl>. Acesso em: 16 nov. 2018.

DE MOLON, R. S. et al. Evaluation of the Host Response in Various Models of Induced Periodontal Disease in Mice. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 3, p. 465–477, 1 mar. 2014.

DE MOLON, R. S. et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 6, p. 1203–1216, 28 jul. 2016.

DEINZER, R. et al. Comparison of experimental gingivitis with persistent gingivitis: differences in clinical parameters and cytokine concentrations. **Journal of periodontal research**, v. 42, n. 4, p. 318–24, ago. 2007.

DINIZ, G. B.; BITTENCOURT, J. C. The Melanin-Concentrating Hormone as an Integrative Peptide Driving Motivated Behaviors. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 11, p. 32, 29 maio 2017.

FOUREAUX, R. DE C. et al. Effects of Probiotic Therapy on Metabolic and Inflammatory Parameters of Rats With Ligature-Induced Periodontitis Associated With Restraint Stress. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 7, p. 975–983, jul. 2014.

GARCIA DE AQUINO, S. et al. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. **Life Sciences**, v. 84, n. 21–22, p. 745–754, 22 maio 2009.

GOMES, M. S. et al. Can Apical Periodontitis Modify Systemic Levels of Inflammatory Markers? A Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 10, p. 1205–1217, out. 2013.

GOYAL, S. et al. Stress and periodontal disease: The link and logic!! **Industrial psychiatry journal**, v. 22, n. 1, p. 4–11, jan. 2013.

HÄGER, C. et al. Running in the wheel: Defining individual severity levels in mice. **PLOS Biology**, v. 16, n. 10, p. e2006159, 18 out. 2018.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 463–469, 24 jul. 2008.

HEINEMEIER, K.; LANGBERG, H.; KJAER, M. Exercise-induced changes in circulating levels of transforming growth factor- β -1 in humans: methodological considerations. **European Journal of Applied Physiology**, v. 90, n. 1–2, p. 171–177, 9 set. 2003.

HIGHFIELD, J. Diagnosis and classification of periodontal disease. **Australian Dental Journal**, v. 54, p. S11–S26, set. 2009.

HUGO, F. N. et al. Chronic stress, depression, and cortisol levels as risk indicators of elevated plaque and gingivitis levels in individuals aged 50 years and older. **Journal of periodontology**, v. 77, n. 6, p. 1008–14, jun. 2006.

JANG, J.-H. et al. Novel analgesic effects of melanin-concentrating hormone on persistent neuropathic and inflammatory pain in mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 707, 15 dez. 2018.

KAUR, G. et al. Periodontal Infectogenomics. **Inflammation and regeneration**, v. 38, p. 8, 2018.

KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17038, 22 jun. 2017.

KIZAKI, T. et al. Effect of Circadian Rhythm on Clinical and Pathophysiological Conditions and Inflammation. **Critical reviews in immunology**, v. 35, n. 4, p. 261–75, 2015.

KOSSE, C. et al. Orexin-driven GAD65 network of the lateral hypothalamus sets physical activity in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 17, p. 4525–4530, 25 abr. 2017.

LIN, M. et al. Different engagement of TLR2 and TLR4 in Porphyromonas gingivalis vs. ligature-induced periodontal bone loss. **Brazilian oral research**, v. 31, p. e63, 21 ago. 2017.

MESSINA, G. et al. Exercise increases the level of plasma orexin A in humans. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 611–616, 1 jan. 2016.

NAPIMOGA, M. H. et al. Quercetin Inhibits Inflammatory Bone Resorption in a Mouse Periodontitis Model. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 12, p. 2316–2321, dez. 2013.

NEWMAN, M. G. et al. **Carranza Periodontia Clínica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2016.

- NUNN, M. E. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. **Periodontology** 2000, v. 32, p. 11–23, 2003.
- OLIVEIRA, J. A. P. et al. Periodontal Disease as a Risk Indicator for Poor Physical Fitness: A Cross-Sectional Observational Study. **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 1, p. 44–52, jan. 2015.
- PAPATHANASSOGLU, E. D. E.; MILTIADOUS, P.; KARANIKOLA, M. N. May BDNF Be Implicated in the Exercise-Mediated Regulation of Inflammation? Critical Review and Synthesis of Evidence. **Biological Research For Nursing**, v. 17, n. 5, p. 521–539, out. 2015.
- PEPPLER, W. T. et al. Voluntary wheel running attenuates lipopolysaccharide-induced liver inflammation in mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 310, n. 10, p. R934–R942, 15 maio 2016.
- PEREZ-LEIGHTON, C. et al. Orexin signaling in rostral lateral hypothalamus and nucleus accumbens shell in the control of spontaneous physical activity in high- and low-activity rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 312, n. 3, p. R338–R346, 1 mar. 2017.
- PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 4, p. 1154–1162, abr. 2005.
- PEYRON, C. et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 23, p. 9996–10015, 1 dez. 1998.
- PITTS, G. C. Body composition in the rat: interactions of exercise, age, sex, and diet. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 246, n. 4, p. R495–R501, abr. 1984.
- PORTO, A. N. et al. Effects of forced alcohol intake associated with chronic stress on the severity of periodontitis: an animal model study. **International journal of dentistry**, v. 2012, p. 465698, 2012.
- PRATESI, A.; TARANTINI, F.; DI BARI, M. Skeletal muscle: an endocrine organ. **Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases**, v. 10, n. 1, p. 11–4, jan. 2013.
- RAI, B. et al. Salivary Stress Markers, Stress, and Periodontitis: A Pilot Study. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 2, p. 287–292, fev. 2011.
- RENERS, M.; BRECX, M. Stress and periodontal disease. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 5, n. 4, p. 199–204, nov. 2007.
- ROBISON, L. S. et al. The effects of volume versus intensity of long-term voluntary exercise on physiology and behavior in C57/B16 mice. **Physiology & Behavior**, v. 194, p. 218–232, out. 2018.
- SCHEIERMANN, C.; KUNISAKI, Y.; FRENETTE, P. S. Circadian control of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 190–198, 8 mar. 2013.

SCHULTE-HERBRÜGGEN, O. et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 160, n. 1–2, p. 204–209, mar. 2005.

SEO, D. Y. et al. Humanized animal exercise model for clinical implication. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 466, n. 9, p. 1673–1687, 21 set. 2014.

STANFORD, T. W.; REES, T. D. Acquired immune suppression and other risk factors/indicators for periodontal disease progression. **Periodontology 2000**, v. 32, p. 118–35, 2003.

STULTS-KOLEHMAINEN, M. A.; SINHA, R. The Effects of Stress on Physical Activity and Exercise. **Sports Medicine**, v. 44, n. 1, p. 81–121, 13 jan. 2014.

SUTCLIFFE, J. G.; DE LECEA, L. The hypocretins: Setting the arousal threshold. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 5, p. 339–348, 1 maio 2002.

TAKEDA, M.; TAKAHASHI, M.; MATSUMOTO, S. Inflammation enhanced brain-derived neurotrophic factor-induced suppression of the voltage-gated potassium currents in small-diameter trigeminal ganglion neurons projecting to the trigeminal nucleus interpolaris/caudalis transition zone. **Neuroscience**, v. 261, p. 223–231, 7 mar. 2014.

TAKEDA, Y. et al. Molar loss and powder diet leads to memory deficit and modifies the mRNA expression of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus of adult mice. **BMC neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 81, 2016.

TAUBMAN, M. A.; KAWAI, T.; HAN, X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 34, n. 5, p. 367–369, maio 2007.

TOKUYAMA, K.; SAITO, M.; OKUDA, H. Effects of wheel running on food intake and weight gain of male and female rats. **Physiology & behavior**, v. 28, n. 5, p. 899–903, maio 1982.

UYSAL, N. et al. Effects of voluntary and involuntary exercise on cognitive functions, and VEGF and BDNF levels in adolescent rats. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 90, n. 1, p. 55–68, 2 jan. 2015.

WHIDDON, B. B.; PALMITER, R. D. Ablation of Neurons Expressing Melanin-Concentrating Hormone (MCH) in Adult Mice Improves Glucose Tolerance Independent of MCH Signaling. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 5, p. 2009–2016, 30 jan. 2013.

YAMANAKA, A. et al. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. **Neuron**, v. 38, n. 5, p. 701–13, 5 jun. 2003.

YAMAZAKI, K. et al. Effect of tooth loss on spatial memory and trkB-mRNA levels in rats. **Hippocampus**, v. 18, n. 6, p. 542–547, 1 jun. 2008.

ZIEGLER, S. et al. Endurance running acutely raises plasma osteoprotegerin and lowers plasma receptor activator of nuclear factor κ B ligand. **Metabolism**, v. 54, n. 7, p. 935–938, jul. 2005.