

**EFEITOS DOS ALIMENTOS FUNCIONAIS E ALTERAÇÕES DE MÚSCULO  
ESQUELETICO INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO A FUMAÇA DE CIGARRO**

**HELIARD RODRIGUES DOS SANTOS CAETANO**

**EFEITOS DOS ALIMENTOS FUNCIONAIS NO TECIDO MUSCULAR  
ESQUELÉTICO DE RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE A FUMAÇA DE  
CIGARRO**

**HELIARD RODRIGUES DOS SANTOS CAETANO**

Defesa apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Dr. Hermann Bremer Neto

636.085 2 Caetano, Heliard Rodrigues dos Santos.  
C128e Efeitos dos alimentos funcionais no tecido muscular esquelético de ratos expostos cronicamente a fumaça de cigarro / Heliard Rodrigues dos Santos Caetano. – Presidente Prudente, 2017.  
25 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2017.

Bibliografia.

Orientador: Dr. Hermann Bremer Neto.

1. Tabagismo. 2. Probiótico. 3. Prebiótico. 4. Simbiótico. 5. Musculo esquelético I. Título.

**HELIARD RODRIGUES DOS SANTOS CAETANO**

**EFEITOS DOS ALIMENTOS FUNCIONAIS NO TECIDO MUSCULAR  
ESQUELÉTICO DE RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE A FUMAÇA DE  
CIGARRO**

Defesa apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 20.de Abril de 2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Hermann Bremer Neto  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches  
Universidade de Santo Amaro-UNISA  
São Paulo-SP

---

Prof. Dr. Macelo George Mungai Chacur  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, que nos criou e foi criativo nesta tarefa. Seu fôlego de vida em mim e foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais e família, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hermann Bremer Neto pelo todo suporte e ajuda, pelas suas correções e incentivos.

Ao Prof. Dr. Osimar Sanches, pelo desprendimento em me ensinar.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

*“A aprendizagem se realiza através da conduta ativa do aluno, que aprende mediante o que ele faz não o que faz o professor”. (Ralph W. Tyler)*

## RESUMO

### **Efeitos dos alimentos funcionais no tecido muscular esquelético de ratos expostos cronicamente a fumaça de cigarro**

**Resumo** O objetivo deste estudo foi analisar através da análise da dimensão fractal os efeitos dos alimentos funcionais probióticos, prebióticos e simbióticos no tecido muscular esquelético em ratos expostos cronicamente a fumaça do cigarro. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito dos alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico, no músculo esquelético, sóleo, em ratos expostos cronicamente a fumaça de cigarro, através da análise da dimensão fractal. Ratos Wistar machos foram randomicamente divididos em oito grupos (n=8). Os animais foram alimentados com dieta padrão, ou suplementados com probiótico, prebiótico e simbiótico e expostos ou não ao tabagismo passivo. Após 180 dias de exposição à fumaça de cigarro, amostras do músculo sóleo foram colhidas para análise histológica e após coloração com Hematoxilina e Eosina, as imagens capturadas foram submetidas à análise da dimensão fractal. Para normalidade dos dados pelo teste de Shapiro Wilk, e análise de variância (ANOVA), post teste de Tukey (p<0,05). Os resultados revelaram que o GCT obteve maior valor de dimensão fractal (DF) de  $1.353 \pm 61$  apresentando diferença significativa dos demais grupos expostos e não expostos a fumaça do cigarro das secções corada em HE do músculo sóleo dos ratos submetidos a exposição crônica a fumaça do cigarro. Os grupos suplementados com alimentos funcionais, GPRO  $1.213 \pm 69$ , GPRE  $1.258 \pm 78$  e GSIM  $1.271 \pm 64$ , e GPROT  $1.326 \pm 59$ , GPRET  $1.293 \pm 59$  e GSIMT  $1.330 \pm 46$  apresentaram uma diminuição significativa da média da dimensão fractal quando comparado ao GCT e não diferiram dos grupos experimentais não tabagistas (p>0,05). Concluindo que a exposição crônica ao tabagismo passivo em ratos, como modelo experimental, induz alterações degenerativas, e os alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico, suplementados na ração, bioremediaram a degeneração, decorrente da exposição crônica passiva ao tabagismo. A dimensão fractal revelou ser uma ferramenta capaz de quantificar alterações inflamatórias no musculo esquelético sóleo.

**Palavras-chave:** Tabagismo • Probióticos • Prebióticos • Simbióticos



## ABSTRACT

### Effects of functional foods on skeletal muscle tissue of rats chronically exposed to cigarette smoke

**Abstract** Male Wistar rats were randomly divided into eight groups (n = 8). The animals were fed standard diet, or supplemented with probiotic, prebiotic and symbiotic and exposed or not to passive smoking. After 180 days of exposure to cigarette smoke, samples from the soleus muscle were collected for histological analysis and after staining with Hematoxylin Eosin, the captured images were submitted to fractal dimension analysis. For normality of the data by the Shapiro Wilk test, and analysis of variance (ANOVA), post test of Tukey ( $p < 0.05$ ). The results revealed a significant increase in the fractal dimension of the HE stained section of the soleus muscle of rats poisoned by chronic exposure to cigarette smoke. The groups supplemented with functional, probiotic, prebiotic and symbiotic foods and smokers presented a significant decrease in the fractal dimension when compared to the smoking control group and did not differ from the non - smoking experimental groups ( $p > 0.05$ ). The results obtained provide convincing evidence that chronic exposure to passive smoking in rats, as an experimental model in vivo, induces inflammatory changes. Functional foods, probiotic, prebiotic and symbiotic, and supplemented in the diet, bioremediation the inflammation, due to chronic passive exposure to smoking. The fractal dimension revealed to be a tool capable of quantifying inflammatory alterations in the soleus skeletal muscle.

**Key words:** Smoking • Probiotics • Prebiotics • Symbiotics

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ARTIGO CIENTIFICO.....</b>	<b>9</b>
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE).....</b>	<b>15</b>
	<b>ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA.</b>	<b>16</b>

## Efeitos dos alimentos funcionais no tecido muscular esquelético de ratos expostos cronicamente a fumaça de cigarro

### Effects of functional foods on skeletal muscle tissue of rats chronically exposed to cigarette smoke

Heliard R. S. Caetano<sup>1</sup> · Viviane A. Santos<sup>1</sup> · Samir Nozawa<sup>1</sup> · Osimar C. Sanches<sup>1</sup> · Renata C. Rossi e Silva<sup>1</sup> · Giovana R. Teixeira<sup>2</sup> · Hermann Bremer-Neto<sup>1</sup>

**Resumo** O objetivo deste estudo foi analisar através da análise da dimensão fractal os efeitos dos alimentos funcionais probióticos, prebióticos e simbióticos no tecido muscular esquelético em ratos expostos cronicamente a fumaça do cigarro. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito dos alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico, no músculo esquelético, sóleo, em ratos expostos cronicamente a fumaça de cigarro, através da análise da dimensão fractal. Ratos Wistar machos foram randomicamente divididos em oito grupos (n=8). Os animais foram alimentados com dieta padrão, ou suplementados com probiótico, prebiótico e simbiótico e expostos ou não ao tabagismo passivo. Após 180 dias de exposição à fumaça de cigarro, amostras do músculo sóleo foram colhidas para análise histológica e após coloração com Hematoxilina e Eosina, as imagens capturadas foram submetidas à análise da dimensão fractal. Para normalidade dos dados pelo teste de Shapiro Wilk, e análise de variância (ANOVA), post teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados revelaram que o GCT obteve maior valor de dimensão fractal (DF) de  $1.353 \pm 61$  apresentando diferença significativa dos demais grupos expostos e não expostos a fumaça do cigarro das secções corada em HE do músculo sóleo dos ratos submetidos a exposição crônica a fumaça do cigarro. Os grupos suplementados com alimentos funcionais, GPRO  $1.213 \pm 69$ , GPRE  $1.258 \pm 78$  e GSIM  $1.271 \pm 64$ , e GPROT  $1.326 \pm 59$ , GPRET  $1.293 \pm 59$  e GSIMT  $1.330 \pm 46$  apresentaram uma diminuição significativa da média da dimensão fractal quando comparado ao GCT e não diferiram dos grupos experimentais não tabagistas ( $p > 0,05$ ). Concluindo que a exposição crônica ao tabagismo passivo em ratos, como modelo experimental, induz alterações degenerativas, e os alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico, suplementados na ração, bioremediaram a degeneração, decorrente da exposição crônica passiva ao tabagismo. A dimensão fractal revelou ser uma ferramenta capaz de quantificar alterações inflamatórias no musculo esquelético sóleo.

**Palavras-chave:** Tabagismo • Probióticos • Prebióticos • Simbióticos

**Abstract** Male Wistar rats were randomly divided into eight groups (n = 8). The animals were fed standard diet, or supplemented with probiotic, prebiotic and symbiotic and exposed or not to passive smoking. After 180 days of exposure to cigarette smoke, samples from the soleus muscle were collected for histological analysis and after staining with Hematoxylin Eosin, the captured images were submitted to fractal dimension analysis. For normality of the data by the Shapiro Wilk test, and analysis of variance (ANOVA), post test of Tukey ( $p < 0.05$ ). The results revealed a significant increase in the fractal dimension of the HE stained section of the soleus muscle of rats poisoned by chronic exposure to cigarette smoke. The groups supplemented with functional, probiotic, prebiotic and symbiotic foods and smokers presented a significant decrease in the fractal dimension when compared to the smoking control group and did not differ from the non - smoking experimental groups ( $p > 0.05$ ). The results obtained provide convincing evidence that chronic exposure to passive smoking in rats, as an experimental model in vivo, induces inflammatory changes. Functional foods, probiotic, prebiotic and symbiotic, and supplemented in the diet, bioremediation the inflammation, due to chronic passive exposure to smoking. The fractal dimension revealed to be a tool capable of quantifying inflammatory alterations in the soleus skeletal muscle.

**Key words:** Smoking • Probiotics • Prebiotics • Symbiotics

---

Hermann Bremer Neto  
hermann@unoeste.br

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Funcionais, Medicina, Universidade do Oeste Paulista, Rua José Bongiovani, 700, Cidade Universitária, Presidente Prudente, SP, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Educação Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia, UNESP, Rua Roberto Simonsen, 305, Presidente Prudente, SP, Brasil.

## Introdução

Pesquisas demonstraram que a fumaça do cigarro (FC) tem efeitos deletérios no sistema músculo-esquelético e piora o prognóstico de várias doenças ortopédicas e procedimentos cirúrgicos. A relevância clínica deste problema colateral, mas importante, é subestimada, levando-se em consideração o alto número de fumantes em todo o mundo (Abate et al. 2013).

Fumantes apresentam maior risco de desenvolver inflamação sistêmica, uma vez que a fumaça do cigarro desencadeia a produção de radicais livres (Church and Pryor 1985; Tappia et al. 1995), assim como pode aumentar os níveis sanguíneos de citocinas pró-inflamatórias, especialmente o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Tang et al. 2010). Na circulação os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  são mais elevados nos fumantes do que nos não fumantes (Van den Borst et al. 2011). Achados histológicos também têm sido utilizados como indicadores do processo inflamatório em músculo esquelético, porém outra ferramenta, dimensão fractal (DF), pode permitir uma análise mais precisa (Ristanović et al. 2014).

A DF permite caracterizar estruturas irregulares em lâminas histológicas e quantificar as alterações existentes (Cross 1997; Pacagnelli et al. 2016), a técnica do *box-counting* é uma das mais utilizadas para determinação da DF. Assim nessa técnica, utiliza-se a sobreposição da imagem com quadrados de lados  $r$  progressivamente menores e, nesse caso,  $N_r$  é a quantidade de quadrados de lado  $r$  necessários para cobrir a imagem, a cada tamanho escolhido. A DF será a inclinação da linha de regressão dos log-valores do tamanho do lado  $r$  e da quantidade de quadrados  $N_r$ . A DF tem sido utilizada como ferramenta diagnóstica de retinopatias, estudos histopatológicos de neoplasias, morfometria de hepatócitos, fibrose hepática e estudos cardíacos (Moreira et al. 2011; Huynh et al. 2015).

O papel dos alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico, tem se destacado na modulação das atividades metabólicas da microbiota do intestino humano e na regulação do sistema imunológico, melhorando a saúde do hospedeiro (Yoo and Kim 2016). Um estudo controlado, randomizado, duplo-cego de fumantes que consumiram *L. Plantarum* cepa 299 (probiótico), durante seis semanas, afetou os parâmetros sistêmicos, ou seja, a pressão arterial sistólica diminuiu, assim como a concentração no sangue de leptina, fibrinogênio, F2-isoprostanos (marcador do estresse oxidativo) e a citocina pró-inflamatória IL-6 (Naruszewicz et al. 2002).

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito dos alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico, no músculo esquelético, sóleo, em ratos expostos cronicamente a fumaça de cigarro, através da análise da DF.

## Material e métodos

### Animais

O experimento foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA - n° 2724/2015). A gestão do Ratos Wistar, e de todos os procedimentos no presente estudo foram realizadas de acordo com as diretrizes experimentais de animais da Universidade do Oeste Paulista, Estado de São Paulo, Brasil.

### Ratos e delineamento experimental

Um total de 64 ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) jovens, 23 dias, foram randomicamente distribuídos em oito grupos (n=8): Controle [ração padrão (Supralab Especial, Alisul, RS, Brasil)]; Probiótico [ração padrão + 2g de probióticos (*Lactobacillus acidophilus*,  $1,0 \times 10^9$  de Unidades Formadoras de Colônias (UFC); *Enterococcus faecium*  $2,1 \times 10^9$  UFC; *Bacillus subtilis*  $2,9 \times 10^9$  UFC; e *Bifidobacterium bifidum*  $2,0 \times 10^9$  UFC por kg de produto)]; Prebiótico [ração padrão + 1g de mananoligossacarídeo - MOS (fração activa,  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,6 derivada de um mananoligossacarídeo, apresentando 30% de  $\alpha$ -mananos, derivados de cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*)]; Simbiótico (ração padrão + 2 g Probióticos + 1 g Prebiótico); Controle Tabagista: [ração padrão + tabagismo (exposição por 1 hora diária a fumaça de cigarro - Tabacalera del Este S.A. - Paraguai)]; Probiótico Tabagista: ração padrão + 2 g probiótico + tabagismo; Prebiótico tabagista: ração padrão + 1g prebiótico + tabagismo; Simbiótico: ração padrão + 2 g probiótico + 1 g prebiótico + tabagismo.

Foi ajustada a concentração média de CO (monóxido de carbono) em 350 ppm (partes por milhão), aferido semanalmente através de um detector de gás específico, modelo TxiPro<sup>®</sup>, da Biosystems (Mello et al. 2006). Os animais foram expostos a fumaça de cigarro, adaptado conforme descrito por Kozma et al. (2014).

Aos 203 dias de idade e 180 de período experimental, todos os ratos foram anestesiados e sacrificados por exsanguinação e imediatamente foi dissecado o músculo sóleo do membro direito de cada animal e fixação em solução tamponada de formalina à 10%.

### Processamento histológico

As amostras do músculo sóleo foram processadas para inclusão em parafina (TOLOSA, 2003). E coradas com Hematoxilina & Eosina (HE), para posterior análise em microscópio óptico (Leica, modelo DM750, Alemanha). As imagens foram capturadas com objetiva de 20x.

### Dimensão Fractal

Para análise da DF do músculo sóleo, as lâminas fotografadas foram binarizadas para leitura e a DF estimada pelo método *box-counting*, por meio do software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH) (Oliveira et al. 2014). O *software* considera o *box-counting* em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço, não considerando, portanto, a textura da imagem. A influência disso é que duas imagens com a mesma distribuição dos pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuirão a mesma dimensão fractal. Dessa forma, a análise das lâminas histológicas fractais baseia-se na relação entre a resolução e a escala avaliada, e o resultado pode ser quantitativamente expresso como a dimensão fractal do objeto que é  $DF = (\log N_r / \log r - 1)$ , sendo  $N_r$  a quantidade de elementos iguais necessários para preencher o objeto original e  $r$  a escala aplicada ao objeto (Figura 1). Com isso, a dimensão fractal calculada com o *software* Image J ficará sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes (Karperien et al. 2008).

### Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk para normalidade dos dados. Como distribuição normal foi demonstrada, ANOVA one-way foi utilizado o teste de Tukey para verificar as diferenças entre os grupos. Para todas as análises, o nível de significância ( $p < 0,05$ ) foi estabelecido em 5%. As análises estatísticas foram realizadas no programa Biostatic 3.1.

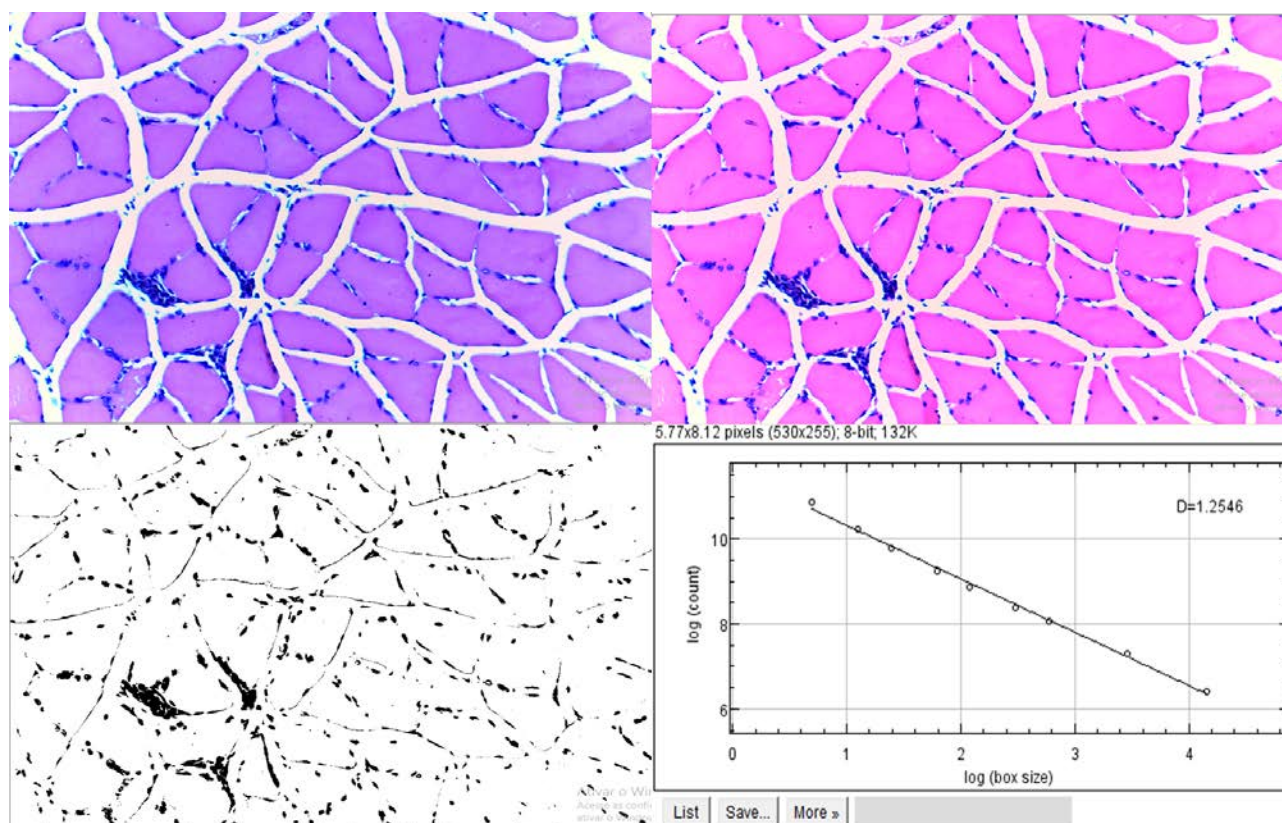
### Resultados

Foi observada que a análise da DF da secção corada em HE do músculo sóleo dos ratos intoxicados pela exposição crônica a fumaça do cigarro aumentaram significativamente no grupo GCT em comparação com o grupo GC ( $p < 0,05$ ). Os grupos suplementados com alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico, e tabagistas apresentaram uma diminuição significativa da média de DF quando comparado ao grupo GCT e não diferiram dos grupos experimentais não tabagistas ( $p > 0,05$ ), GC, GPRO, GPRE e GSIM (Tabela 1).

**Tabela 1** – Análise da dimensão fractal do músculo sóleo de ratos Wistar expostos passivamente ao tabagismo e suplementados ou não com probiótico, prebiótico ou simbiótico.

Tratamentos							
Não Tabagista				Tabagista			
GC	GPRO	GPRE	GSIM	GC	GPRO	GPRE	GSIM
1,273 ± 71 <sup>a</sup>	1,213 ± 69 <sup>a</sup>	1,258 ± 78 <sup>a</sup>	1,271 ± 64 <sup>a</sup>	1,353 ± 61 <sup>b</sup>	1,326 ± 59 <sup>a</sup>	1,293 ± 59 <sup>a</sup>	1,330 ± 46 <sup>a</sup>

Valores de média e desvio padrão da dimensão fractal; GC grupo controle; GPRO: grupo probiótico; GPRE: grupo prebiótico; GSIM: grupo simbiótico; GCT: grupo controle tabagismo; GPROT: grupo probiótico tabagismo; GPRET: grupo prebiótico tabagismo; GSIMT: grupo simbiótico tabagismo. Letras minúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). (ANOVA).



**Figura 1** – A) Corte histológico do músculo sóleo direito corados em Hematoxilina e Eosina (HE), aumento 20x. B) Processo de binarização. C) Imagem de HE após o processo de binarização. Observam-se os núcleos celulares em preto e todo o restante da célula (citoplasma, membrana plasmática e outros elementos), em branco. D) Regressão linear pela sobreposição de quadrados ( $N_r$ ) de lados ( $r$ ) progressivamente menores, sendo  $N_r$  a quantidade de quadrados de lado  $r$  necessários para cobrir a imagem, a cada tamanho escolhido. A dimensão fractal é a inclinação da linha de regressão dos valores dos dois log. Foi utilizado o teste de ANOVA one way.

## Discussão

Os resultados obtidos sugerem que a análise pela DF pode ser utilizada para detectar alterações degenerativas no músculo sóleo, o que demonstra também sua importância na identificação precoce de possíveis patologias no músculo esquelético e decorrente da exposição crônica ao tabagismo. A DF é um método muito útil para a caracterização de estruturas irregulares (Cross 1997; Carvalho et al. 2010), permitindo quantificar as alterações nas estruturas teciduais, assim como evitar possíveis erros entre avaliadores (Keipes et al. 1993; Oliveira et al. 2014). Os métodos histológicos mais comumente utilizados avaliam as estruturas qualitativamente e a reprodutibilidade e o conhecimento preciso do erro classificatório não são mensuráveis nesse método, pois o avaliador qualifica as imagens através de características teciduais da morfologia celular, tamanho, posição do núcleo e presença de inflamação (Camargo Filho et al. 2011; Ozaki et al. 2015). Por ser uma metodologia de avaliação subjetiva é comum existirem variações nas análises entre diferentes histopatologistas (Oliveira et al. 2014). A DF também foi utilizada em várias áreas da medicina, sendo a oncologia, neurologia, oftalmologia, radiologia e cardiologia, útil na caracterização e identificação de possíveis alterações em diversos tecidos e análise de estruturas irregulares e complexas (Cross 1997; Oliveira et al. 2014).

Modelos experimentais de exposição crônica ao tabagismo, são muito utilizados para o estudo e compreensão dos mecanismos fisiopatológicos. O tabagismo está atrelado ao estresse oxidativo e a uma série de reações inflamatórias, que acarreta elevação de citocinas pró-inflamatórias e inflamação, assim como o aumento do estresse oxidativo, causando um ciclo vicioso e que gera inflamação crônica (Sangani and Ghio 2011). Estudos clínicos e experimentais demonstraram aumento de citocinas pró-inflamatórias (Rom et al. 2012), pelo fato da nicotina induzir estresse oxidativo, que produz radicais livres, e agride a camada lipídica da membrana celular, alterando as propriedades das fibras musculares, (Law and Hackshaw 1996). As citocinas pró-inflamatórias, em especial o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral), são responsáveis pela agressão ao músculo esquelético (Law and Hackshaw 1996; Valsoni et al. 2011).

Os resultados benéficos observados podem ser devido à ação do probiótico, prebiótico e ou simbiótico, como possíveis ferramentas para modificar a composição da microbiota intestinal, contribuindo para a saúde do hospedeiro e a homeostase intestinal/imunológica (Bindels and Delzenne 2013). Além disso, a alteração da microbiota altera benéficamente a produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), que são os principais metabólitos bacterianos

produzidos com a fermentação de fibras dietéticas e amidos resistentes, por bactérias anaeróbias colônicas específicas (Tan et al. 2014). Esses sacarídeos indigestíveis, principalmente os prebióticos, são os principais substratos que conduzem à produção de SCFAs (Englyst et al. 1992) e que atuam como potentes mediadores anti-inflamatórios, inibindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos e neutrófilos (Maslowski et al. 2009).

De acordo com o presente estudo pode demonstrar que análise DF é capaz de quantificar as alterações musculares em lâminas histológicas, e os alimentos funcionais probióticos, prebióticos e simbióticos atuam no trato gastrointestinal minimizando o aumento do número de bactérias patógenas na flora intestinal, favorecendo menores chances de elevação da inflamação sistêmica e possível translocação bacteriana dos enterócitos para corrente sanguínea. Assim estes alimentos são capazes de biorremediar às alterações apresentadas pela DF no músculo sóleo de ratos sob exposição crônica ao tabagismo passivo. Entretanto, dentre as limitações do presente estudo, a importância de analisar os marcadores inflamatórios (IL- 6, IL- 8, IL- 1 e TNF- $\alpha$ ), análise imunohistoquímica para avaliação de presença de apoptose, ou proliferação. Por fim, sugere-se que futuros estudos correlacionem com os alimentos funcionais e seus efeitos benéficos, e possíveis alterações no músculo estriado esquelético devido a exposição ao tabagismo crônico, e observar os efeitos fisiológicos e fisiopatológicos a médio e longo prazo.

## Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que a exposição crônica ao tabagismo passivo em ratos, como modelo experimental, induz alterações degenerativas. Os alimentos funcionais, probiótico, prebiótico e simbiótico, suplementados na ração atenuam os efeitos da exposição passiva ao tabagismo crônica. A dimensão fractal revelou ser uma ferramenta capaz de quantificar alterações degenerativas no músculo esquelético sóleo.

**Conflito de interesse** Os autores não têm conflitos para declarar.

## Referências

- Abate M, Vanni D, Pantalone A, Salini V (2013) Cigarette smoking and musculoskeletal disorders. *Muscles Ligaments Tendons J* 3:63–9. doi: 10.11138/mltj/2013.3.2.063
- Bindels LB, Delzenne NM (2013) Muscle wasting: The gut microbiota as a new therapeutic target? *Int J Biochem Cell Biol* 45:2186–2190. doi: 10.1016/j.biocel.2013.06.021
- Camargo Filho JCS, Garcia BC, Kodama FY, et al (2011) Effects of Aerobic Exercise on the Skeletal Muscle of Rats Exposed to Cigarette Smoke. *Rev Bras Med do Esporte* 17:416–419. doi: 10.1590/S1517-86922011000600010
- Carvalho RF, Castan EP, Coelho CA, et al (2010) Heart failure increases atrogin-1 and MuRF1 gene expression in skeletal muscle with fiber type-specific atrophy. *J Mol Histol* 41:81–87. doi: 10.1007/s10735-010-9262-x
- Church DF, Pryor WA (1985) Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* 64:111–126.
- Cross s. s. (1997) Fractals in Pathology. *J Pathol* 182:1–8.
- Englyst HN, Kingman SM, Cummings JH (1992) Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur J Clin Nutr* 46 Suppl 2:S33-550.
- Huynh HN, Pradana A, Chew LY (2015) The Complexity of Sequences Generated by the Arc-Fractal System. *PLoS One* 1:1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0117365
- Karperien A, Jelinek HF, Leandro JGG, et al (2008) Automated detection of proliferative retinopathy in clinical practice. *Clin Ophthalmol* 2:109. doi: 10.2147/OPHTH.S1579
- Keipes M, Ries F, Dicato M (1993) Of the British coastline and the interest of fractals in medicine. *Biomed Pharmacother* 47:409–415. doi: 10.1016/0753-3322(93)90107-V
- Kozma R de las H, Alves EM, Barbosa-de-Oliveira VA, et al (2014) Um novo modelo experimental murino de enfisema: enfisema induzido pela fumaça do cigarro em ratos Wistar\*. *J Bras Pneumol* 40:46–54.
- Law MR, Hackshaw AK (1996) Environmental tobacco smoke. *Br Med Bull* 52:22–34.
- Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461:1282–1286. doi: 10.1038/nature08530
- Mello PRBO, Thelma S, Botelho C (2006) Influência da exposição a fumaça lateral do cigarro sobre o ganho de peso e o consumo alimentar de ratas gestantes: análise do peso e do comprimento dos filhotes ao nascimento. *Rev Bras Ginecol e Obs* 28:143–150. doi: 10.1590/S0100-72032006000300002
- Moreira RD, Moriel AR, Murta Junior LO, et al (2011) Dimensão fractal na quantificação do grau de rejeição celular

miocárdica pós-transplante cardíaco. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 26:155–163. doi: 10.1590/S0102-76382011000200004

- Naruszewicz M, Johansson M, Zapolska-Downar D, Bukowska H (2002) Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *Am J Clin Nutr* 76:1249–1255.
- Oliveira MAB, Brandi AC, Santos CA, et al (2014) Comparison of fractal dimension and Shannon entropy in myocytes from rats treated with histidine-tryptophan-glutamate and histidine-tryptophan cetoglutamate. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 29:156–162. doi: 10.5935/1678-9741.20140052
- Ozaki GAT, Camargo RCT, Koike TE, et al (2015) Fractal Analysis of Skeletal Muscle Tissue of Rats Subjected to Stretch Injury. *Int J Morphol* 33:908–913. doi: 10.4067/S0717-95022015000300017
- Pacagnelli FL, Karênina A, Almeida D, et al (2016) Artigo Original Dimensão Fractal na Quantificação da Disfunção Cardíaca Induzida por Hipertensão Pulmonar Experimental em Ratos. *Arq Bras Cardiol* 1–7.
- Ristanović D, Stefanović BD, Puškaš N (2014) Fractal analysis of dendrite morphology using modified box-counting method. *Neurosci Res* 84:64–67. doi: 10.1016/j.neures.2014.04.005
- Rom O, Kaisari S, Aizenbud D, Reznick AZ (2012) Identification of possible cigarette smoke constituents responsible for muscle catabolism. *J Muscle Res Cell Motil* 33:199–208. doi: 10.1007/s10974-012-9299-4
- Sangani RG, Ghio AJ (2011) Lung injury after cigarette smoking is particle related. *Int J COPD* 6:191–198. doi: 10.2147/COPD.S14911
- Tan J, McKenzie C, Potamitis M, et al (2014) The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In: *Advances in immunology*. pp 91–119
- Tang K, Wagner PD, Breen EC (2010) TNF- $\alpha$ -mediated reduction in PGC-1 $\alpha$  may impair skeletal muscle function after cigarette smoke exposure. *J Cell Physiol* 222:320–327. doi: 10.1002/jcp.21955
- Tappia PS, Troughton KL, Langley-Evans SC, Grimble RF (1995) Cigarette smoking influences cytokine production and antioxidant defences. *Clin Sci (Lond)* 88:485–9. doi: 10.1042/cs0880485
- Valsoni BCG, Bonfim MR, Urban JB, et al (2011) Influência do tabagismo passivo associado ao exercício físico realizado por ratas durante prenhez e lactação, sobre o desenvolvimento dos filhotes. *Rev Bras Ginecol Obs* 33:150–157.
- Van den Borst B, Koster A, Yu B, et al (2011) Is age-related decline in lean mass and physical function accelerated by obstructive lung disease or smoking? *Thorax* 66:961–9. doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-200010
- Yoo J, Kim S (2016) Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders. *Nutrients* 8:173. doi: 10.3390/nu8030173



**ANEXO A**  
**APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**  
**(CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE)**

---

**UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista**

---

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação  
 PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

## Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITO DO PREBIÓTICO, PROBIÓTICO E SIMBIÓTICO SOBRE A PROTEÍNA CASPASE 3 DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS FUMANTES PASSIVOS", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 2724 e tendo como participante(s) HERMANN BREMER NETO (responsável), HELLARD RODRIGUES DOS SANTOS CAETANO (discente), TAYNA CRISTINO MARQUES (discente), foi avaliado e APR. COM RECOMENDAÇÃO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.


Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APR. COM RECOMENDAÇÃO em reunião realizada em 12/08/2015.

Vigência do projeto: 01/2016 a 07/2017.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
WISTAR	96	0			BIOTERIO CENTRAL

Presidente Prudente, 28 de Junho de 2016.

  
 Prof. Doutor Roberto Garcia Jr.  
 Coordenador Científico da CPDI

  
 Prof. Ms. Adriana Falbo de Brito  
 Coordenadora da CEUA - UNOESTE

## ANEXO B

### NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTIFICA

Journal of Muscle Research and Cell Motility

Editor-in-Chief: Mathias Gautel

Executive Editor: C.C. Ashley; D.J. Manstein; A.V. Somlyo; J.R. Sellers; S.B. Marston; K. Oiwa

ISSN: 0142-4319 (print version)

ISSN: 1573-2657 (electronic version)

Journal no. 10974

#### Instructions for Authors

##### Close

Types of papers

Research papers:

Papers may be as short or as long as the findings justify but should be complete; preliminary findings will not normally be accepted. Halftone illustrations must be grouped into plates, the number of which should be related to the extent and significance of the observations. Although no arbitrary limits on the number of plates are set, only five free plates will be allowed and plates in excess of this number will be charged to the authors. Colour plates will also be charged to the Authors.

Sequence papers:

Papers which discuss unique or comparative data on proteins of interest within the broad field of the Journal, may be submitted provided that the separate conditions stated in Volume 12 page 1 are met. Sequence papers will also normally be limited to four sides of the Journal.

Reviews:

The purpose of reviews will be to summarize and analyse topics of current interest and progress; a personal viewpoint is encouraged while a historical one is not. There are no strict limits on the length of reviews or their illustration but 8000 words of text (exclusive of bibliography) plus two figures or tables is often found to be satisfactory to both author and reader.

News and Views:

These brief reviews are intended to highlight and discuss new data and ideas, not necessarily of the author but certainly discussed from his/her point of view. News and Views will be treated as Fast Stream publications. They will be limited to four sides of the journal, i.e. 3500 words including bibliography and figures (allow 250 words for a simple figure).

Correspondence:

Comment on papers published in the Journal can be submitted in the form of scientific correspondence. Such letters should fit one side of the Journal (i.e. 800 words). Correspondence will be published with the original author's response to the comment, which must fit the same length restriction. Publication of both comment and response are dependent on editorial approval.

Rapid Communications:

Rapid communications are published in print and online, and provide a particularly fast PUBLICATION PROCESS i.e. within 7 days for research papers of exceptional importance. The manuscripts will also be handled in an accelerated way in the print phase, with a time from submission to online publication of 26-28 days if no revisions are required. Manuscripts requiring more than minor revision will be rejected, but can enter the regular PUBLISHING stream at the discretion of the editors with their original submission date.

The scope of the manuscripts can be either essentially complete research work reporting on definite observations, or rigorous work reporting seminal observations that are likely to lead to a paradigm shift or open up new research perspectives. Text limit under 2,500 words. No more than 4 display items (4 figures and/or tables).

Manuscripts reporting Proteomic data:

The proteomics guidelines detailed in the following two publications must be followed. Papers not adhering to these guidelines will be rejected without review.

1.) Carr S. et al: The need for guidelines in publication of peptide and protein identification data: Working Group on Publication Guidelines for Peptide and Protein Identification Data. *Mol Cell Proteomics*. 2004 Jun;3(6):531-3.

2.) Bradshaw RA, Burlingame AL, Carr S, Aebersold R.: Reporting protein identification data: the next generation of guidelines. *Mol Cell Proteomics*. 2006 May;5(5):787-8.

Manuscript Submission

Manuscript Submission

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

Permissions

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

Online Submission

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

Additional remark Manuscript Submission

Submissions must be accompanied by a submission letter explaining why the manuscript is suitable for publication in the *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. Authors should provide up to 5 potential referees with their names, addresses and e-mail addresses, of which at least two should be from the Editorial Board. Authors may exclude up to 3 reviewers with a one-sentence explanation. The editors retain the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Cover Suggestion:

Authors are encouraged to submit cover suggestions for the *Journal* at the time of acceptance. This can be either original images such as microscope images or molecular structures, or artistically rendered artwork relevant to the topic. Submit your suggestion together with the final version of your manuscript as a TIFF file at 300 dpi resolution and scaled to a size of 21cm x 21cm. Cover suggestions require a brief caption for the figure of ca. 50 words.

Title page

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

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

Keywords

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

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

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

## Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

## Abbreviations

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

## Footnotes

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

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lowercase letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

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

## Scientific style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Genus and species names should be in italics.
- Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols etc.:

Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities

Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)

Bold for vectors, tensors, and matrices.

## References

### Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

### Reference list

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

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [ISSN LTWA](#)

If you are unsure, please use the full journal title.

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

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

Tables

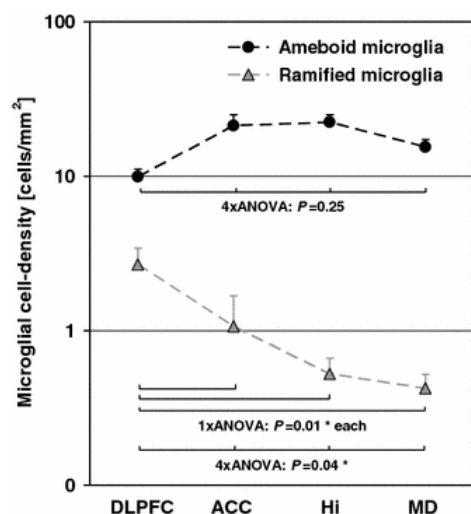
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

## Electronic Figure Submission

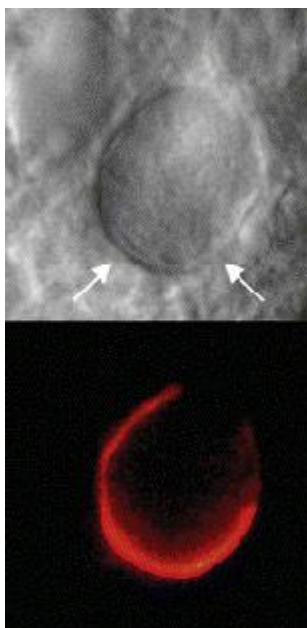
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

## Line Art



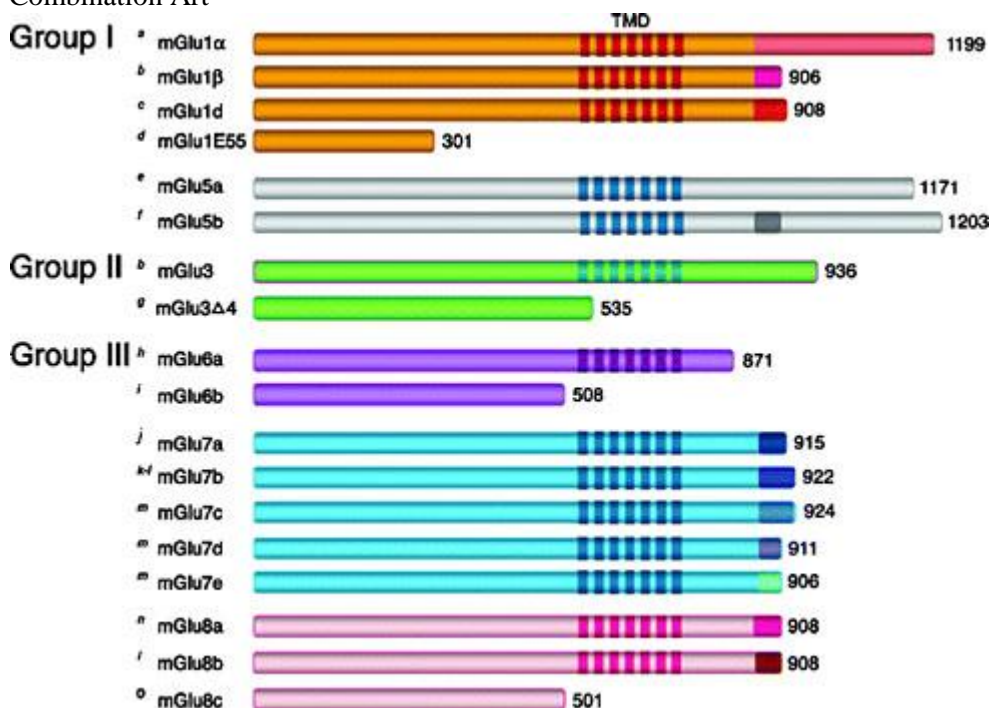
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

#### Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

#### Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

#### Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

#### Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

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

#### Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

#### Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

#### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

#### Accessibility

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

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

#### Electronic Supplementary Material

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

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

#### Submission

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

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

#### Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

#### Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

#### Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

#### Specialized Formats

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

#### Collecting Multiple Files

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

#### Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

#### Captions

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

#### Processing of supplementary files

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

#### Accessibility

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

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

#### Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki. It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

Animal experiments: Papers describing experiments on living animals should provide (i) a full description of any anaesthetic and surgical procedure used, and (ii) evidence that all possible steps were taken to avoid animals suffering at each stage of the experiment. In experiments involving the use of muscle relaxants, authors must describe the precautions taken to ensure adequate anaesthesia (e.g. see *J. Physiol.* (1990) vol. 420, pp. xii-xiii). Papers describing experiments on isolated tissues must indicate precisely how the donor tissue was obtained. Appropriate guidelines for the care and use of animals can be found in the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publications No. 80-23, revised 1978).

Declaration: Authors will be required to sign a declaration that the research has been conducted within the above guidelines and under the terms of all relevant local legislation. The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements.

#### English Language Editing



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

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.
- [English language tutorial](#)
- [Nature Research Editing Service](#)
- [American Journal Experts](#)

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

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

为便于编辑和评审专家准确评估您稿件中陈述的研究工作，您需要确保您的英语语言质量足以令人理解。如果您需要英文写作方面的帮助，您可以考虑：

- 请一位以英语为母语的同事审核您的稿件是否表意清晰。
- 查看一些有关英语写作中常见语言错误的教程。
- 

使用专业语言编辑服务，编辑人员会对英语进行润色，以确保您的意思表达清晰，并识别需要您复核的问题。我们的附属机构 Nature Research Editing Service 和合作伙伴 American Journal Experts 即可提供此类服务。

- [教程](#)
- [Nature Research Editing Service](#)
- [American Journal Experts](#)

请注意，使用语言编辑服务并非在期刊上发表文章的必要条件，同时也并不意味或保证文章将被选中进行同行评议或被接受。

如果您的稿件被接受，在发表之前，我们的文字编辑会检查您的文稿拼写是否规范以及文体是否正式。

エディターと査読者があなたの論文を正しく評価するには、使用されている英語の質が十分に高いことが必要とされます。英語での論文執筆に際してサポートが必要な場合には、次のオプションがあります：

- 英語を母国語とする同僚に、原稿で使用されている英語が明確であるかをチェックしてもらう。
- 英語で執筆する際によくある間違いに関する英語のチュートリアルを参照する。
- プロの英文校正サービスを利用する。校正者が原稿の意味を明確にしたり、問題点を指摘し、英語を向上させます。Nature Research Editing Service と American Journal Experts の2つは弊社と提携しているサービスです。

- [英語のチュートリアル](#)
- [Nature Research Editing Service](#)
- [American Journal Experts](#)

英文校正サービスの利用は、このジャーナルに掲載されるための条件ではないこと、また論文審査や受理を保証するものではないことに留意してください。

原稿が受理されますと、出版前に弊社のコピーエディターがスペルと体裁のチェックを行います

영어 원고의 경우, 에디터 및 리뷰어들이 귀하의 원고에 실린 결과물을 정확하게 평가할 수 있도록, 그들이 충분히 이해할 수 있을 만한 수준으로 작성되어야 합니다. 만약 영작문과 관련하여 도움을 받기를 원하신다면 다음의 사항들을 고려하여 주십시오:

- 귀하의 원고의 표현을 명확히 해줄 영어 원어민 동료들 찾아서 리뷰를 의뢰합니다.
- 영어 튜토리얼 페이지에 방문하여 영어로 글을 쓸 때 자주하는 실수들을 확인합니다.
- 리뷰에 대비하여, 원고의 의미를 명확하게 해주고 리뷰에서 요구하는 문제점들을 식별해서 영문 수준을 향상시켜주는 전문 영문 교정 서비스를 이용합니다. Nature Research Editing Service와 American Journal Experts에서 저희와 협약을 통해 서비스를 제공하고 있습니다.

- [영어 튜토리얼 페이지](#)
- [Nature Research Editing Service](#)
- [American Journal Experts](#)

영문 교정 서비스는 게재를 위한 요구사항은 아니며, 해당 서비스의 이용이 피어 리뷰에 논문이 선택되거나 게재가 수락되는 것을 의미하거나 보장하지 않습니다.

원고가 수락될 경우, 출판 전 저희측 편집자에 의해 원고의 철자 및 문체를 검수하는 과정을 거치게 됩니다.

#### Ethical Responsibilities of Authors

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

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

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

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

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.
- Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not** accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Adding and/or deleting authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the role of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.
- Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.

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

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

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.
- The author's institution may be informed.

After acceptance

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

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

Copyright transfer

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

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

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

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

Proof reading

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

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

Online First

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

Open Choice