

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

CURSO DE FISIOTERAPIA

JULIA ENGELMANN

**EFEITOS DO ULTRA-SOM PULSADO ASSOCIADO À GEL DMSO
SOBRE A VIA PRÓ-INFLAMATÓRIA EM MODELO ANIMAL DE
LESÃO MUSCULAR.**

CRICIÚMA, NOVEMBRO 2010

JULIA ENGEMANN

**EFEITOS DO ULTRA-SOM PULSADO ASSOCIADO À GEL DMSO
SOBRE A VIA PRÓ-INFLAMATÓRIA EM MODELO ANIMAL DE
LESÃO MUSCULAR.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para Obtenção do Grau de Bacharel, no Curso de
Fisioterapia da Universidade do Extremo Sul
Catarinense

Orientador: Prof. Ms. Eduardo Ghisi Victor

CRICIÚMA, NOVEMBRO 2010

JULIA ENGELMANN

**EFEITOS DO ULTRA-SOM PULSADO ASSOCIADO À GEL DMSO
SOBRE A VIA PRÓ-INFLAMATÓRIA EM MODELO ANIMAL DE
LESÃO MUSCULAR.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para Obtenção do Grau de Fisioterapeuta, no
Curso de Fisioterapia da Universidade do Extremo
Sul Catarinense

Criciúma, 24 de Novembro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Prof. Ms. Eduardo Ghisi Victor

1º Avaliador: _____

2º Avaliador: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a duas pessoas, minha mãe que é meu porto seguro, que esta sempre me esperando com palavras de carinho e de conforto que me ergue e me da forças em qualquer momento, minha luz; e ao meu marido, meu anjo, minha família, meu eterno amor, que esta sempre ao meu lado me apoiando e me amando em todos os momentos.

Agradeço também ao meu pai que mesmo com aquele jeito distante sei que me ama e se preocupa comigo e que fez de tudo pra me criar da melhor maneira possível, e conseguiu. Obrigado pai!

Agradeço também as pessoas que sempre torceram e rezaram por mim, que soube das dificuldades e que de um jeito e de outro me ajudaram nessa minha conquista.

***“Somos feitos para superar obstáculos,
resolver problemas, atingir metas. Sem
obstáculos a superar ou metas a atingir, não
existe satisfação nem felicidade.”***

Maltz

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – PROJETO DE PESQUISA	01
CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO.....	20
CAPÍTULO III – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA.....	41

Capítulo I – Projeto de Pesquisa

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DA SAÚDE - UNASAU
CURSO DE FISIOTERAPIA**

Julia Engelmann

**EFEITOS DO ULTRA-SOM PULSADO ASSOCIADO À GEL DMSO
SOBRE A VIA PRÓ-INFLAMATÓRIA EM MODELO ANIMAL DE
LESÃO MUSCULAR.**

Criciúma, Agosto 2010

JULIA ENGELMANN

**EFEITOS DO ULTRA-SOM PULSADO ASSOCIADO À GEL DMSO
SOBRE A VIA PRÓ-INFLAMATÓRIA EM MODELO ANIMAL DE
LESÃO MUSCULAR.**

Projeto de Pesquisa apresentado a disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) para obtenção do Grau de Bacharel em Fisioterapia.

Orientador: Prof Ms Eduardo Ghisi Victor.

CRICIÚMA, Agosto 2010

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
3. OBJETIVOS.....	11
3.1 Objetivo geral	10
3.2 Objetivos Específicos	10
4. METODOLOGIA	11
4.1 Animais	11
4.2 Protocolo de lesão muscular	12
4.3 Tratamento	13
4.4 Extração do tecido.....	13
4.5 Western blot	14
4.6 Análise estatística:	14
5. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DA PESQUISA	15
6. PREVISÃO ORÇAMENTÁRIA.....	15
7. REFERÊNCIAS:	16

RESUMO:

Aumento nos níveis de muitas citocinas pró-inflamatórias tais como fator de necrose tumoral ($TNF\alpha$), interleucina -1β ($IL-1\beta$), entre outras, pode iniciar um processo de resposta inflamatória sistêmica e disfunção e morte celular. Esses eventos são marcantes em diversas situações patológicas, incluindo lesões musculares. A terapia com ultra-som pulsado (USP) é usada na reabilitação fisioterapêutica devido a seus efeitos fisiológicos, como a cicatrização e regeneração muscular, produzindo mudanças na permeabilidade de membrana e estimulando o transporte de substâncias de mensageiros secundários. Dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente dipolar usado para solubilizar pequenas moléculas orgânicas, é altamente permeável, e comumente usado em estudos no músculo esquelético como solvente para numerosas drogas. No entanto, o uso de ultra-som pulsado associado a gel de DMSO por reverter a inflamação decorrente da lesão muscular não foi investigado. Dessa forma, o objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos do uso do ultra-som pulsado e DMSO sobre as moléculas pró-inflamatórias em modelo animal de lesão muscular traumática. Para tanto, serão utilizados 48 ratos Wistar, divididos randomicamente em nove grupos: Grupo 1: Sham (Sem lesão muscular); Grupo 2: Lesão muscular; Grupo 3: Lesão muscular + gel salina (0.9%); Grupo 4: Lesão muscular + gel DMSO (15 mg/kg); Grupo 5: Lesão muscular + USP (0.8 W/cm²) + gel salina (0.9%); Grupo 6: Lesão muscular + USP (0.8 W/cm²) + gel DMSO (15 mg/kg). O tratamento com USP será aplicado em 2, 12, 24 e 48 horas após o trauma. Após 1 hora da última aplicação os animais serão decapitados e o tecido muscular ao redor da lesão será removido cirurgicamente. As amostras serão homogeneizadas, processadas e em seguida analisadas por Western blot para quantificação dos níveis protéicos das moléculas pró-inflamatórias e citocinas. Como as citocinas e sua via de sinalização intracelular estão envolvidas no processo de cicatrização muscular, o uso do ultra-som pulsado em conjunto com DMSO podem agir efetivamente nas moléculas NF κ B e JNK, reduzir seus níveis protéicos e acelerar o processo de regeneração tecidual.

Palavras chaves: inflamação; lesão muscular; citocinas; ultra-som; DMSO

1. INTRODUÇÃO

A lesão muscular ocorre por uma variedade de mecanismos, como forças diretas, incluindo lacerações e contusões no músculo, e forças indiretas relacionadas à tensão exercida sobre o músculo (FUKUSHIMA, 2001). Frequentemente ocorrem em práticas esportivas e atividades diárias. Porém, o processo de reparo é geralmente similar em muitos casos (LI et al., 2005). Em geral, a lesão muscular esquelética tem uma regeneração rápida formando miotubos em três dias. Funcionalmente as fibras musculares são reinervadas em 4 a 5 dias, e um reparo total após 21 a 28 dias (AMARAL, 2001). Embora o processo de regeneração do músculo esquelético tenha sido amplamente estudado, questões permanecem obscuras, especialmente os efeitos de vários tratamentos comumente usados para estimular o processo de regeneração muscular, como também o envolvimento da via pró-inflamatória neste processo.

Neste processo lesão/cicatrização, a inflamação é marcante e está relacionada ao tempo para ocorrência deste. A inflamação é um evento celular inicial e é caracterizada pela migração de células polimorfonucleares, formação de coágulo e atividade de substâncias biologicamente ativas como prostaglandinas, serotoninas e fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). O processo inflamatório está acompanhado por altos níveis de citocinas. Citocinas é um termo genérico empregado para designar um heterogêneo grupo de proteínas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Constituem um grupo de fatores extracelulares que podem ser produzidos por diversas células, como monócitos, macrófagos, linfócitos, e outras que não sejam linfóides. São proteínas de baixo peso molecular, extremamente potente, que iniciam sua ação através da ligação a receptores específicos, provocando alterações da síntese do RNA e de proteínas de diferentes células do organismo. Podem agir no local onde são produzidas, em células próximas ou são secretadas para a circulação, com efeitos à distância. Produzidas pelos macrófagos e responsáveis por estimular ou mesmo inibir as reações inflamatórias, podemos citar algumas citocinas: IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-16, TNF α , IFN α , INF β .

Uma vez agindo em seus receptores específicos, o TNF α e a IL-1 β , por

citar algumas, ativam suas vias moleculares envolvidas com a sinalização intracelular inflamatória denominada via intracelular pró-inflamatória. Essas citocinas, como outras ativam tanto a via IKK/NFkB quanto a via da JNK e, em ambos os casos a produção de citocinas pró-inflamatória é potencializada, levando a uma retroalimentação positiva e aumentando o quadro inflamatório, possivelmente dificultando ou retardando a regeneração muscular.

Ações fisioterapêuticas têm demonstrado excelentes resultados no processo de regeneração muscular, porém a ampliação do conhecimento terapêutico para este processo se faz necessária. A terapia com ultra-som pulsado (USP) é usada na reabilitação fisioterapêutica devido a seus efeitos fisiológicos, como a cicatrização e regeneração muscular, produzindo mudanças na permeabilidade de membrana e estimulando o transporte de substâncias de mensageiros secundários. Devido a essas características da TPU, sua utilização pode ser associada com fármacos com efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (Fonoforese), com o objetivo de potencializar os efeitos cicatrizantes dessas duas terapias (HILL et al., 2005), tal qual o DMSO. Dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente dipolar usado para solubilizar pequenas moléculas orgânicas, é altamente permeável, e comumente usado em estudos no músculo esquelético como solvente para numerosas drogas ou outros compostos.

Muitas propriedades farmacológicas e terapêuticas, já verificadas, resultam da sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e vários fármacos sem alterar, de forma irreversível, a configuração molecular. Em adição, alguns trabalhos científicos têm observado que o gel DMSO apresenta características antioxidantes e, também, antiinflamatórias.

Devido às propriedades antiinflamatórias do DMSO sua aplicação na lesão muscular em conjunto com ultra-som pulsado e DMSO podem ter efeitos positivos na cicatrização por reduzir a via pró-inflamatória, NFkB, JNK e TLR. A partir dessas informações, o objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos do uso do ultra-som pulsado associado a gel DMSO sobre as moléculas pró-inflamatórias em modelo animal de lesão muscular traumática. Por fim, como a via pró-inflamatória está envolvida no processo de regeneração muscular e o uso da USP em conjunto com DMSO pode agir de forma efetiva em vias intracelulares inflamatórias, hipotetizamos que o tratamento proposto no presente estudo possa apresentar um melhor processo

de cicatrização.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os músculos representam um grande contingente de massa no corpo humano, constituindo 40 a 45 por cento da superfície total. A composição estrutural consiste em milhares de fibras musculares, nervos, vasos sanguíneos e unidos extracelularmente por tecido conjuntivo. Cada fibra muscular é constituída por miofibrilas (elementos contráteis), cercada por uma parte solúvel denominada retículo sarcoplasmático, contendo uma matriz celular e organelas (HUARD et al., 2002). Diversos fatores podem levar a dano na estrutura muscular e resultar em um dos problemas mais incorrentes, principalmente no meio esportivo; a lesão muscular. Desses problemas, 90 por cento de todas as lesões esportivas relatadas estão entre contusão e tensão.

A lesão muscular ocorre por uma variedade de mecanismos, como forças diretas, incluindo lacerações e contusões no músculo, e forças indiretas relacionadas à tensão exercida sobre o músculo (FUKUSHIMA, 2001). Porém, o processo de reparo é geralmente similar em muitos casos (LI et al, 2005). Em geral, a lesão muscular esquelética tem uma regeneração rápida formando miotubos em três dias. Funcionalmente as fibras musculares são reinervadas em 4 a 5 dias, e um reparo total após 21 a 28 dias (AMARAL, 2001). Conforme Jarvinen (2005), independente da causa (contusão, tensão ou laceração) a regeneração/cicatrização do músculo esquelético danificado segue um padrão constante que pode ser descrito em três fases: 1, fase de lesão, caracterizada por uma ruptura resultando em necrose das miofibrilas, formação de hematoma entre a ruptura provocada no músculo, e reação celular inflamatória; 2, fase de reparo, consiste em fagocitose no tecido necrosado, regeneração das miofibrilas e produção concomitante de tecido conjuntivo cicatrizado, como também crescimento capilar dentro da área lesionada; e 3, fase de remodelamento, período durante o qual a maturação das miofibras regeneradas, contração e reorganização do tecido cicatrizado, e recuperação da capacidade funcional do músculo ocorre. Cabe ressaltar que as últimas duas fases – reparo e remodelação – são usualmente associadas ou sobrepostas (JARVINEN, 2005).

Neste processo lesão/cicatrização, a inflamação é marcante e está relacionada ao tempo para ocorrência deste. A inflamação é um evento celular inicial e é caracterizada pela migração de células polimorfonucleares, formação de coágulo e atividade de substâncias biologicamente ativas como prostaglandinas, serotoninas e fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Neste período a liberação de histamina aumenta a permeabilidade dos capilares, ocasionando edema na região lesada. Os neutrófilos têm a função de eliminar as partículas estranhas do local lesado, os mastócitos fagocitam as bactérias e debris do tecido lesionado (KITCHEN e BAZIN, 2001; STARKEY, 2002; LOW e REED, 2003).

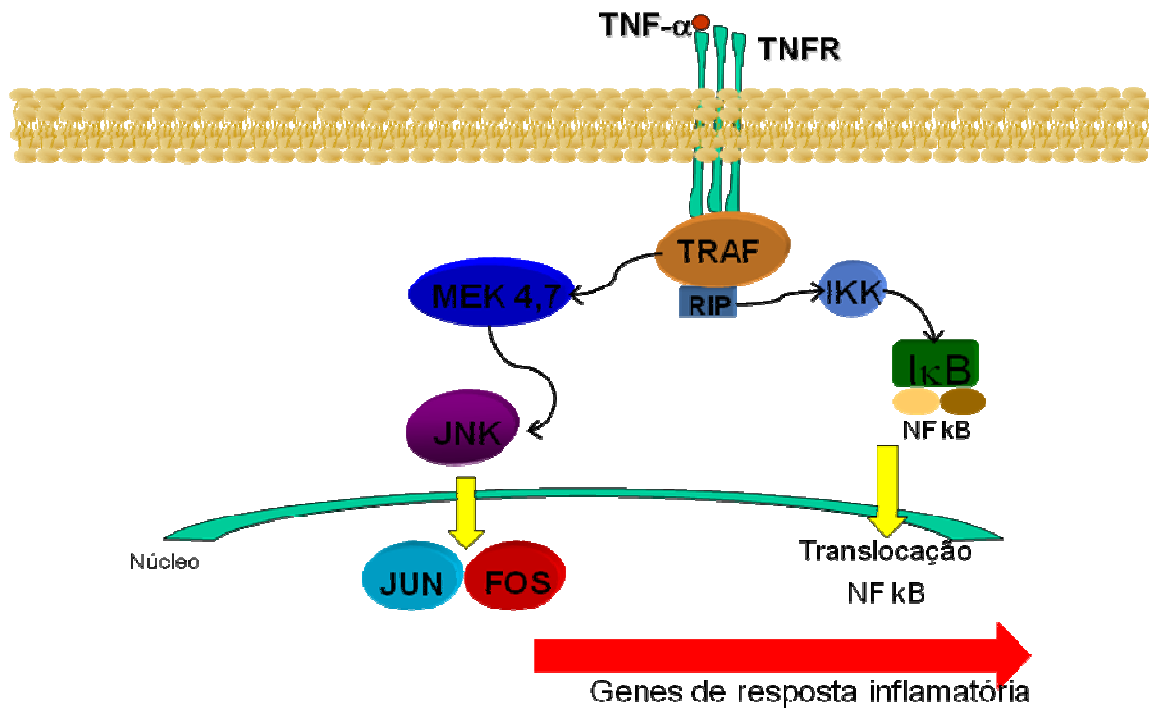
Danos musculares traumáticos tais como aqueles induzidos por frio extremo, esmagamento ou toxinas, podem resultar em profundas alterações histopatológicas e perda da função muscular (exemplo perda de mais de 40% da força muscular) que pode não ser recuperada após duas semanas ou mais (CRISCO et al., 1994). A recuperação dessas injúrias requer que miofibrilas sejam degradadas e regeneradas via maturação de células satélites. O intervalo de início e a extensão da infiltração de células inflamatórias, principalmente macrófagos, podem afetar ambos os processos de degeneração e regeneração (ANDERSON et al., 1995). A relação da inflamação para a regeneração tem sido pouco estudada, mas acredita-se que os mediadores inflamatórios, como IL-6, IL-1 β , TNF α , TGF β , estão envolvidos neste processo (para revisão ver ZHANG e TRACEY, 1998).

A capacidade das células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos de produzir citocinas após o dano muscular é um interessante paradoxo. Citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral (TNF α) regulam a adesão de moléculas intercelulares requeridas no fluxo de neutrófilos e macrófagos. Macrófagos liberam citocinas envolvidas na quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células satélites necessárias para o reparo tecidual. As citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-1 β parecem desempenhar um papel central nestas conexões. Agindo através de TNFR1 (receptor 1 de TNF α), o TNF α ativa substratos intracelulares que participam do controle da transcrição de genes de reposta inflamatória, modula proteínas participantes do controle de apoptose e regula respostas de crescimento e diferenciação celular (GUPTA, 2002). Um dos principais substratos intermediários da via de sinalização do TNF α é a serina quinase JNK

(DEMPSEY et al., 2003). Uma vez ativada, a JNK tem a função primária de induzir a associação dos produtos dos genes de resposta imediata c-Jun e c-Fos, levando à formação do fator de transcrição dimérico AP-1 (DEMPSEY et al., 2003). O tumor de necrose tumoral alfa é um importante produto do macrófago ativado, como também um mediador de diversas funções em tecido inflamado e lesionado. O $TNF\alpha$ é expresso como uma proteína transmembrana integral de 26 kDa e originalmente identificado como causador da síndrome da perda muscular, é agora reconhecido por ter funções pleiotróficas. Em adição, mediando respostas apoptóticas/citotóxicas e inflamatórias, o $TNF\alpha$ modula crescimento e diferenciação para muitos tipos celulares. No músculo esquelético como em outros tecidos, pele, pulmão, SNC, o $TNF\alpha$ contribui para degeneração e regeneração. O $TNF\alpha$ pode mediar atrofia pela perda de proteínas de forma dependente do NFkB (LI et al., 1998).

O fator de transcrição relacionado a sinais pró-inflamatórios (NFkB) é um dos importantes ativadores da resposta inflamatória (BARNES e KARIM, 1997). Em muitas células, o NFkB se localiza no citoplasma mas transloca-se rapidamente para o núcleo sob ativação do sistema imuno inato ou citocinas pro-inflamatórias, como o $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$. Translocação nuclear do NFkB depende da degradação de proteínas inibidoras específicas chamadas de inibidoras do NFkB ou Ikb, via essa que requer fosforilação e degradação do Ikb. A fosforilação do Ikb é mediada pelo complexo enzimático especializado, o IKK conforme a Figura 1. A via intracelular de transdução do sinal inflamatório (IKK/NFkB) tem sido envolvida em vários processos, incluindo atrofia muscular (NOVAK e DAVIES, 2004), mas o envolvimento dessas moléculas no processo de cicatrização/regeneração muscular não tem sido relatado. No mais, a molécula ativada por estresse extracelular, incluindo processo inflamatório (Janus N-terminal Kinase ou JNK) é ativado pelo mesmo processo e participa na ativação de sinais inflamatórios.

Figura 1. Via intracelular de sinalização induzido pela ativação do TNF- α .



Fonte: De Souza CT, 2010

Embora o processo de regeneração do músculo esquelético tenha sido amplamente estudado, questões permanecem obscuras, especialmente os efeitos de vários tratamentos comumente usados para estimular o processo de regeneração muscular. Neste sentido, um dos tratamentos amplamente utilizado é o uso de ultra-som. Ultra-som pulsado é uma modalidade eletroterapêutica que tem sido utilizada tipicamente para diminuir os sintomas da inflamação (dor e edema) e aumentar a velocidade de cicatrização em muitas condições, incluindo lesão de tecidos moles, lesões epidérmicas e musculares, artrite reumatóide e edema crônico. Absorção de ondas ultra-sônicas pelos tecidos causa oscilações em seu interior, levando a alterações biológicas (CRAIG, 1999).

O Ultra-som teve sua descoberta em 1880, quando o casal Pierre e Marie Curie descobriu o efeito piezoelétrico através da aplicação de uma corrente elétrica

senoidal sobre um cristal de quartzo colocado entre duas placas metálicas. Estes cientistas constataram a geração de uma vibração de alta frequência. Langevin, Tournier e Howeck construíram pela primeira vez, em 1917, em Paris, um aparelho piezoelétrico que, embora tivesse utilidade para a Marinha, apresentava aplicações no campo da biologia, observando-se que sob a ação dos ultra-sons que emitia, morriam pequenos peixes depois de grandes convulsões (HAAR, 2007).

Na Fisioterapia a terapia ultra-sônica é definida pelas oscilações de ondas cinéticas ou mecânicas produzidas pelo transdutor vibratório, que aplicado sobre a pele atravessa e penetra no organismo em diferentes profundidades, dependendo da frequência, que varia de 0,75 a 3,0 MHz (ROBERTSON e WARD, 1997), sendo utilizado no tratamento de pequenas lesões musculares, acelerando o processo de cicatrização muscular e epitelial (HAAR, 2007).

Dentro deste contexto, a terapia com ultra-som pulsado é comumente usada na reabilitação fisioterapêutica devido a seus efeitos fisiológicos térmicos e não térmicos. Segundo Markert (2005) os estímulos não térmicos de ultra-sonicação são a principal via de ação do USP, ao contrário dos efeitos térmicos da terapia com ultra-som contínuo (MARKET, 2005). A ação terapêutica da ultra-sonicação pode produzir efeitos de cicatrização em biomarcadores de regeneração muscular, principalmente lesões por contusões e produzir mudanças na permeabilidade de membrana e estimular o transporte de substâncias de mensageiros secundários, como cálcio através da membrana celular (WILKIN, 2004). Devido a essas características do USP, sua utilização pode ser associada com fármacos como os antioxidantes e os antiinflamatórios (Fonoforese), com o objetivo de potencializar os efeitos cicatrizantes dessas duas terapias (HILL et al., 2005), como o DMSO, por exemplo.

Dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente dipolar amplamente usado para solubilizar pequenas moléculas orgânicas (CAMICI, 2006). Atualmente, DMSO é comumente usado em estudos no músculo esquelético como um seletivo antioxidante ou como solvente para numerosas drogas (VELASCO, 2003). Sendo altamente permeável, o DMSO tem ação não enzimática e seu poder antioxidante se dá primariamente como scavenger de radical hidroxil e de outras ERO (MUHANRAJ, 1998). Estudos postularam que a lesão muscular isquêmica induz o paradoxo do

cálcio e do oxigênio que ocorrem por altas concentrações de cálcio intracelular, e o DMSO por possuir efeito direto nesse íon pode proteger a célula de danos estruturais (MÉIS, 1998; VELASCO, 2003).

O DMSO é uma substância orgânica de fórmula química C_2H_6SO (ROSENBAUM et al., 1965), peso molecular 78 e temperatura de congelamento $18,5^{\circ}C$ (BRAYTON, 1986). Quando administrado topicamente reage com a água do ar e dos tecidos por meio de reação exotérmica (BRAYTON, 1986), que pode estar relacionada às suas ações como fármaco e à sua capacidade de solvente (ROSENBAUM et al., 1965). O dimetilsufóxido (DMSO) é um composto conhecido desde a segunda metade do século XIX como um solvente orgânico potente. Por ser um subproduto da indústria de extração de celulose e, portanto, facilmente disponível, passou a ser largamente utilizado a partir da década de quarenta do século XX, para fins industriais. Duas décadas mais tarde, o DMSO foi introduzido na medicina veterinária (ALSUP, 1984).

Muitas propriedades farmacológicas e terapêuticas, já verificadas, resultam da sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e vários fármacos sem alterar, de forma irreversível, a configuração molecular (RUBIN, 1983). Em adição, parece que o DMSO possui ação antiinflamatória.

Devido às propriedades anti-inflamatórias do DMSO sua aplicação na lesão muscular em conjunto com ultra-som pulsado podem ter efeitos positivos na cicatrização por reduzir a via pró-inflamatória, NFkB, JNK e TLR. Por fim, como a via pró-inflamatória está envolvida no processo de regeneração muscular e o uso do USP em conjunto com DMSO podem agir de forma efetiva em vias intracelulares inflamatórias, hipotetizamos que o presente estudo tem grandes chances de obter resultados satisfatórios.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar os efeitos do ultra-som pulsado associado à gel DMSO sobre as moléculas da via pró-inflamatória em modelo animal de lesão muscular.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a ativação da vias pró-inflamatórias intracelular NFkB e JNK após indução experimental de lesão muscular;
- Avaliar os efeitos do ultra-som pulsado na expressão do NFkB e JNK após indução experimental de lesão muscular;
- Avaliar os efeitos do ultra-som pulsado associado a gel DMSO nos níveis proteicos do NFkB e JNK após indução experimental de lesão muscular.

4. METODOLOGIA

O estudo será realizado no Laboratório de Síntese de Compostos com Atividade Biológica – LASICOM em conjunto com o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício LAFIBE, localizados na Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC e vinculados ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) desta instituição. Todos os procedimentos experimentais serão realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este projeto foi aprovado em seus procedimentos éticos pelo Comitê de Ética em para o Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense (protocolo n. 08/2010).

4.1. Animais

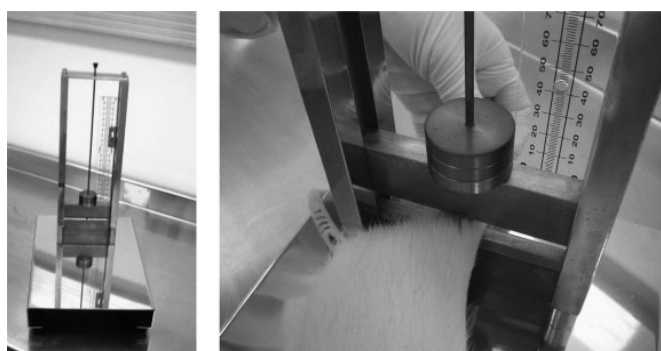
No presente estudo serão utilizados 48 ratos Wistar (200-250g), dividido em 6 grupos; a saber: **Grupo 1:** Sham (Músculo sem lesão); **Grupo 2:** Lesão muscular sem tratamento; **Grupo 3:** Lesão muscular e tratamento com gel salina (0.9%); **Grupo 4:** Lesão muscular e tratamento com gel DMSO (15 mg/kg); **Grupo 5:** Lesão muscular e tratamento com USP (0.8 W/cm²) e gel saline (0.9%); **Grupo 6:** Lesão muscular e tratamento com USP (0.8 W/cm²) e gel DMSO (15 mg/kg). Os animais serão acondicionados em 4 animais por caixa, com ciclo claro - escuro de 12 horas (07:00 às 19:00) (Claro 7:00h) e comida e água *ad libitum*. O ambiente será mantido a temperatura de 23 ± 1° C. A utilização dos animais seguirá um protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética e seguirá os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996). O descarte dos animais utilizado neste experimento será o acondicionamento em saco branco leitoso e encaminhados para freezer (conservação) na universidade. Após conservação, serão coletados e transportados por empresa terceirizada. Os resíduos são tratados fisicamente e posteriormente encaminhados para disposição

final em aterro sanitário. Todos os procedimentos são conforme RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). A amostra será dividida randomicamente em nove grupos:

4.2. Protocolo de lesão muscular

O modelo de trauma muscular será desenvolvido de acordo com Rizzi e colaboradores (2006). Os animais serão anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (20mg/kg). Posteriormente, a lesão no gastrocnêmio será realizada por um único impacto por trauma direto de uma prensa desenvolvida pelo Centro Industrial de Equipamentos de Ensino e Pesquisa (CIDEP/RS, Brasil). A lesão será produzida por deslocamento de uma massa metálica (0,459 Kg) acoplada de uma guia com 18 cm de altura. O impacto produz uma energia cinética de 0,811 Joules, conforme especificações do equipamento (Figura 2). Os animais controles serão anestesiados para assegurar a padronização, porém expostos ao equipamento sem o trauma muscular.

Figura 2- Equipamento para trauma muscular



Fonte: LASICOM

4.3. Tratamento

O tratamento com ultra-som pulsado (Imbramed, Brazil) ocorrerá por 6 minutos de duração, frequência de 1.0 MHz, intensidade de 0.8 W/cm², área de radiação efetiva [ERA] 1 cm² será aplicado em 2, 12, 24 e 48 horas após o trauma. A área tratada com USP será de aproximadamente 2 cm (RIZZI et al., 2006). O movimento do cabeçote será circular de acordo com Saliba e colaboradores (SALIBA et al., 2007). Após 1 hora da última aplicação os animais serão decapitados e o tecido muscular ao redor da lesão será removido cirurgicamente (FREITAS, 2007). A amostra do músculo gastrocnêmio será imediatamente colocada em tampão de extração protéica e homogeneizada com Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, Westbury, New York, New York, USA).

4.4. Extração do tecido

Após 1 hora da última aplicação os animais serão decapitados e o tecido muscular ao redor da lesão será removido cirurgicamente e imediatamente serão homogeneizados em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C, com o uso de homogeneizador Polytron operado em velocidade máxima. Durante e após o procedimento, o material homogeneizado será mantido em banho de gelo para evitar a danos às proteínas. Ao final da extração será adicionado Triton X-100 10% em todas as amostras e mantidas em gelo. Após quarenta minutos, os materiais extraídos e homogeneizados serão submetidos à centrifugação, utilizando-se a velocidade de 11.000 rpm por 40 minutos a 4°C, para remover o material insolúvel. Do sobrenadante uma parte será utilizada para determinar a concentração protéica de cada amostra pelo método colorimétrico de biureto (BRADFORD, 1976); na parte restante será acrescido tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970), DTT 200 mM (proporção de 5:1), mantido sempre a 4°C até o momento de submeter à fervura a 100°C durante 5 minutos, e posteriormente aplicados em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) para avaliação dos níveis de proteínas.

4.5. Western blot

Alíquotas contendo 250 µg de proteína por amostra serão aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 1,5 mm de espessura. A eletroforese será realizada em cuba de minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE será submetido a 25 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento e 120 volts até o final do gel de resolução. Na seqüência, as proteínas separadas no SDS-PAGE, serão transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *Bio Rad*, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, sob refrigeração contínua por gelo. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas serão incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, a temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas serão lavadas com solução basal por 3 sessões de 10 minutos e incubadas com anticorpos específicos sob agitação constante por uma noite a 4°C (*overnight*). Serão então, incubadas a seguir em solução com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (detecção pela técnica de quimioluminescência), durante 2 horas à temperatura ambiente. Após, as membranas serão incubadas por dois minutos em substrato enzimático e expostas ao filme de RX em cassete de revelação autoradiográfica com uso de revelador e fixador radiográfico. A intensidade das bandas será determinada através da leitura das autoradiografias por densitometria ótica, utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation).

4.6. Análise estatística:

Os resultados serão expressos como média \pm erro padrão da média. Será utilizada análise de variância, seguida de teste para comparação múltipla de médias. Será adotado o nível de significância $P < 0.05$.

5. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DA PESQUISA

Atividades	Calendário										
	2010										
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N
Referencial Teórico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Comitê de Ética		X	X								
Preparação do gel salina + DMSO + Au-NPs				X	X						
Tratamento com o Ultra- som + DMSO + Au- NPs e sacrifício					X	X	X				
Análise e interpretação final dos resultados							X	X	X	X	
Elaboração final do Projeto								X	X	X	
Defesa											X

6. PREVISÃO ORÇAMENTÁRIA

Discriminação	Valor (R\$)
48 ratos Wistar	576,00
Quatro anticorpos	5.200,00
TOTAL	5.776,00

7. REFERÊNCIAS:

- ALSUP EM; DEBOWES RM. **Dimethyl sulfoxide**. Journal of the American Veterinary Medical Association 185:1011-1014, 1984.
- AMARAL, AC, PARIZOTTO NA, SALVINI TF. **Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration os skeletal muscle in mice**. Lasers Med. Sci. 16:44-51, 2001
- ANDERSON, J. E., MITCHELL, C. M., MCGEACHIE, J. K., AND GROUDS, M. D. **The time course of basic fibroblast growth factor expression in crush-injured skeletal muscles of SJL/J and BALB/c mice**. Exp Cell Res 216, 325.334.7, 1995.
- BARNES, P.J., AND KARIN, M. **Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases**. N. Engl. J. Med. **336**: 1066–1071, 1997.
- BRADFORD MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Anal Biochem* 72, 248–254, 1976.
- BRAYTON CF. **Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review**. Cornell Veterinarian 76:76-90, 1986.
- CAMICI GG; STEFFEL J; AKHMEDOV A. **Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation**. Circulation 114,1512-1521, 2006.
- CRAIG JA; BRADLEYJ J; WALSH DM. **Delayed Onset Muscle Soreness: Lack of Effect of Therapeutic Ultrasound in Humans**. Arch. Phys. Med. Rehabil. 80, 318-323, 1999.
- CRISCO, J. J., JOKL, P., HEINER, G. T., CONNELL, M. D., AND PANJABI, M. M. **A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology**. Am J Sports Med 22, 702.710, 1994.
- DEMPSEY PW, DOYLE SE, HE JQ, CHENG G. **The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily**. Cytokine Growth Factor Rev.14(3-4):193-209, 2003.
- FREITAS LS; FREITAS TP; SILVEIRA PC. **Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury**. Cell Biology International 31, 482-488, 2007.
- FUKUSHIMA K; BADLANI N; USAS A. **The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration**. American journal of sports medicine 29, 394-402, 2001.
- GUPTA S. **A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling**. J Clin Immunol. 4, 185-194, 2002.

- HAAR TG. **Therapeutic applications of ultrasound**. Biophysics & Molecular. 2007
- HILL GE; FENWICK S; MATTHEWS BJ. **Ultrasound in medicine & biology** 31, 1701–1706, 2005.
- HUARD J. **Muscle injuries and repair: current trends in research**. The journal of bone and joint surgery 26, 84-89, 2002.
- JARVINEN HU; TAH ET. **Muscle Injures. Biology and treatment**. The American Journal of Sports Medicine 33, 123-129, 2005.
- KITCHEN S; BAZIN S. **Eletroterapia de Clayton**. Editora Manole, São Paulo, 10^a edição, 1998.
- Laemmli, UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature 227, 680–685, 1970.
- LI G. **Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats**. Physiological Research 54, 193-199, 2005.
- LI, Q., AND VERMA, I.M. **NF- κ B regulation in the immune system**. Nat. Rev. Immunol. 2:725–734, 2002.
- LOW J; REED A. **Eletroterapia Explicada: princípios e prática**. Ed. Manole, São Paulo, pp. 187-228, 2003.
- MARKERT CD. **Nonthermal Ultrasound and Exercise in Skeletal Muscle Regeneration**. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation 86, 1304-1310, 2005.
- MEIS L. **Control of heat production by the Ca⁺² - atpase of rabbit and trout sarcoplasmic reticulum**. American Journal of Physiology. Cell Physiology 274,1738-1744, 1998.
- MOHANRAJ P; MEROLA J; WRIGHT VP. Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions. **Journal of Applied Physiology** 84, 1960-1966.,1998.
- NOWAK, K.J., AND DAVIES, K.E. **Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment**. EMBO Rep. 5, 872-876, 2004.
- RIZZI CF; MAURIZ JL; CORRÊA DSF. **Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the Nuclear Factor (NF)- κ B Signaling Pathway in Traumatized Muscle**. Lasers in Surgery and Medicine 38, 704-713, 2006.
- Robertson, T. A., Grounds, M. D., and Papadimitriou, J. M. **Elucidation of aspects of murine skeletal muscle regeneration using local and whole body irradiation**. J Anat 181, 265-276, 1992

- ROSENBAUM EE; HERSCHLER RJ; JACOB SW. **Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders.** *Journal of the American Medical Association* 192, 309-313, 1965.
- RUBIN LR. **Toxicologic update of dimethyl sulfoxide.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 411, 06-10, 1983.
- SALIBA S; Mistry DJ; PERRIN DH; GIECK J; WELTMAN A. **Phonophoresis and the absorption of dexamethasone in the presence of an occlusive dressing.** *Journal of Athletic Training* 42(3), 349-54, 2007.
- STARKEY C. **Recursos terapêuticos em fisioterapia.** Ed. Manole, São Paulo, pp. 304-311, 2002.
- VELASCO R; TRUJILLO X; VASQUEZ C. **Effect of Dimethyl Sulfoxide on Excitation-Contraction Coupling in Chicken Slow Skeletal Muscle.** *Journal of Pharmacological Sciences* 93, 149-154, 2003.
- WILKIN LD, MERRICK MA; KIRBY TE. **Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion.** *International J of sports Med* 25, 73-77, 2004.
- ZHANG, M., AND TRACEY, K. J. **Tumor Necrosis Factor.** In *The Cytokine Handbook* (Thomson, A., ed) pp. 517-548, Academic Press, San Diego, 1998.

Capítulo II – Artigo Científico

Efeitos do ultra-som pulsado associado a gel DMSO reduzem expressão de moléculas pró-inflamatórias em modelo animal de lesão muscular.

¹Julia Engelmann; ²Marcelo F Vitto; ²Patricia A Cesconetto; ³Paulo C Silveira, ³Jonathann C Possato; ⁴Emilio L Streck, ^{2,*}Claudio T De Souza; ³Marcos Marques S Paula; ^{1,3}Eduardo G Victor

¹Curso de Fisioterapia, Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, Criciúma, SC;

²Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Esforço – LAFIBE, Programa do Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS, Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, Criciúma, SC;

³Laboratorio de Síntese e Complexos Multifuncionais, Programa do Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS, Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, Criciúma, SC;

⁴Laboratório de Fisiopatologia, Programa do Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS, Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, Criciúma, SC;

*Autor correspondente: Claudio Teodoro de Souza, PhD. Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brasil.

Fax: + 55 (48) 3431-2539

E-mail: ctsouza@unesc.net

RESUMO

A lesão muscular tem elevada prevalência e incidência, principalmente em esportista. Alguns estudos têm demonstrado um aumento nos marcadores pró-inflamatórios durante e após a lesão muscular, a níveis sistêmicos e locais. Neste sentido, intervenções que reduzam a ativação inflamatória parecem ser de grande interesse na área. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do uso do ultra-som pulsado e DMSO sobre as moléculas pró-inflamatórias em modelo animal de lesão muscular traumática. Para tanto, foram utilizados 48 ratos Wistar, divididos randomicamente em seis grupos: Grupo 1: Sham (Sem lesão muscular); Grupo 2: Lesão muscular; Grupo 3: Lesão muscular + gel salina (0.9%); Grupo 4: Lesão muscular + gel DMSO (15 mg/kg); Grupo 5: Lesão muscular + USP (0.8 W/cm²) + gel salina (0.9%) e Grupo 6: Lesão muscular + USP (0.8 W/cm²) + gel DMSO (15 mg/kg). O tratamento com USP foi aplicado em 2, 12, 24 e 48 horas após o trauma. Após 1 hora da última aplicação os animais foram decapitados e o tecido muscular ao redor da lesão removido cirurgicamente. As amostras foram homogeneizadas e em seguida analisadas por Western blot para quantificação dos níveis protéicos das moléculas pró-inflamatórias, TNF α e IL-1 β JNK e NFkB. A partir do Western blot observamos aumento dos níveis protéicos de TNF α (4,9 vezes); IL-1 β (3,6 vezes); fosforilação da JNK (4,2 vezes) e NFkB (3,8 vezes) no grupo submetido à lesão muscular quando comparado ao grupo sham. No entanto, o uso associado de ultra-som pulsado com DMSO resultou em significativa redução dos níveis de TNF α (2,2 vezes); de IL-1 β (2,1 vezes); da fosforilação da JNK (2,4 vezes) e do NFkB (2,1 vezes) quando comparado ao grupo lesão. O uso tópico de salina e gel DMSO isolados ou mesmo ultra-som associado a gel salina não alterou os níveis protéicos de TNF α , IL-1 β , fosforilação da JNK e NFkB. Os resultados demonstram que o uso de UPS associado a gel DMSO pode reduzir o processo inflamatório decorrente de lesão muscular traumática.

Palavras chaves: inflamação; lesão muscular; citocinas; ultra-som; DMSO

ABSTRACT

The muscle injury has a high prevalence and incidence, mainly in the sport. Some studies have shown an increase in pro-inflammatory markers during and after muscle injury, the systemic and local levels. In this way, interventions that reduce the inflammatory activation appear to be of great interest in the area. Thus, the purpose of this study was to evaluate the effect of therapeutic pulsed ultrasound (TPU) and DMSO on the pro-inflammatory molecules in an animal model of traumatic muscle injury. Thus, 48 Wistar rats were divided randomly into six groups: Group 1: Sham (no muscular trauma), Group 2: muscular trauma, Group 3: muscular trauma + saline gel (0.9%), Group 4: muscular trauma + DMSO gel (15 mg / kg), Group 5: muscular trauma + TPU (0.8 W/cm²) + saline gel (0.9%), Group 6: muscular trauma + TPU (0.8 W/cm²) + DMSO gel (15 mg / kg). The TPU treatment was applied in 2, 12, 24 and 48 hours after trauma. After 1 hour of the last application the animals were decapitated and muscle tissue surgically removed. The samples were homogenized and analyzed by Western blot to quantify proinflammatory protein levels: TNF α , IL-1 β , NFkB and JNK. We observed increase of protein levels of TNF α (3.9 -fold), IL-1 β (3.6 -fold), JNK phosphorylation (4.2 -fold), and NFkB (3.8 -fold) in muscular trauma group (group 2) when compared with sham group (group 1). However, the combined therapeutic pulsed ultrasound with DMSO (group 6) resulted in significantly reduced levels of TNF α (2.2 -fold), IL-1 β (2.1 -fold), JNK phosphorylation (2.4 -fold), and NFkB (2.1 -fold) when compared to muscular trauma group. The topical use of DMSO gel and saline alone or combined with ultrasound gel saline did not alter the protein levels of TNF α , IL-1 β , phosphorylation of JNK, and NFkB. The results demonstrate that the TPU associated with DMSO gel can reduce inflammatory process in traumatic muscle injury.

INTRODUÇÃO

Qualquer indivíduo que pratique exercícios físicos de forma recreacional ou profissional está sujeito a lesões musculares esqueléticas. A lesão muscular ocorre por uma variedade de mecanismos, incluindo lacerações, contusões ou ainda àquelas relacionadas à tensão exercida sobre o músculo⁽¹⁾. Independente de ocorrer em práticas esportivas ou atividades diárias gera custos físicos, emocionais e econômicos. Estudos à respeito de melhor prevenção e/ou tratamento dessas ocorrências são necessários uma vez que inevitavelmente o esporte ou pratica regular de exercícios físicos regulares predispoem os indivíduos à lesão muscular. Funcionalmente as fibras musculares são reinervadas em 4 a 5 dias, e um reparo total após 21 a 28 dias^(2,3). Dependendo do grau e da causa, a lesão muscular esquelética tem uma regeneração rápida formando miotubos em três dias. Algumas recuperações requerem que miofibrilas sejam degradadas e regeneradas via maturação de células satélites. O intervalo de início e a extensão da infiltração de células inflamatórias, principalmente macrófagos, podem afetar ambos os processos de degeneração e regeneração⁽⁴⁾. Embora o processo de regeneração do músculo esquelético tenha sido amplamente estudado, questões permanecem obscuras, especialmente os efeitos de vários tratamentos comumente usados para estimular o processo de regeneração muscular, como também o envolvimento da via pró-inflamatória neste processo.

A inflamação é um evento celular inicial e é caracterizada, dentre outras, por altos níveis de citocinas. Citocinas é um termo genérico empregado para designar um heterogêneo grupo de proteínas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Constituem um grupo de fatores extracelulares que podem ser produzidos por diversas células, como monócitos, macrófagos, linfócitos, e outras

que não sejam linfóides. Uma vez agindo em seus receptores específicos, o $TNF\alpha$ e a $IL-1\beta$, por citar algumas, ativam suas vias moleculares envolvidas com a sinalização intracelular inflamatória denominada via intracelular pró-inflamatória^(5,6). Essas citocinas, como outras, ativam tanto a via IKK/NFkB quanto a via da JNK e, em ambos os casos a produção de citocinas pró-inflamatória é potencializada (para revisão ver 6), aumentando o quadro inflamatório e, possivelmente, dificultando ou retardando a regeneração muscular.

Intervenções fisioterapêuticas têm demonstrado excelentes resultados no processo de regeneração muscular, porém a ampliação do conhecimento para este processo se faz necessária. A terapia com ultra-som pulsado (USP) é usada na reabilitação fisioterapêutica devido a seus efeitos fisiológicos, como a cicatrização e regeneração muscular, produzindo mudanças na permeabilidade de membrana e estimulando o transporte de substâncias de mensageiros secundários⁽⁷⁾. Devido a essas características da USP, sua utilização pode ser associada com fármacos com efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (Fonoforese), com o objetivo de potencializar os efeitos cicatrizantes dessas duas terapias⁽⁸⁾, tal qual o DMSO. Dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente dipolar usado para solubilizar pequenas moléculas orgânicas, é altamente permeável, e comumente usado em estudos no músculo esquelético como solvente para numerosas drogas ou outros compostos^(9,10). Interessantemente o DMSO tem sido estudo por suas ações antiinflamatórias⁽¹⁰⁾. Como há relação entre ativação inflamatória e regeneração muscular; a aplicação do DMSO na lesão muscular em conjunto com ultra-som pulsado pode ter efeitos positivos na regeneração muscular. A partir dessa linha de raciocínio objetivamos avaliar efeitos do ultra-som pulsado associado a gel DMSO sobre as moléculas da via pró-inflamatória em modelo animal de lesão muscular.

MÉTODOS

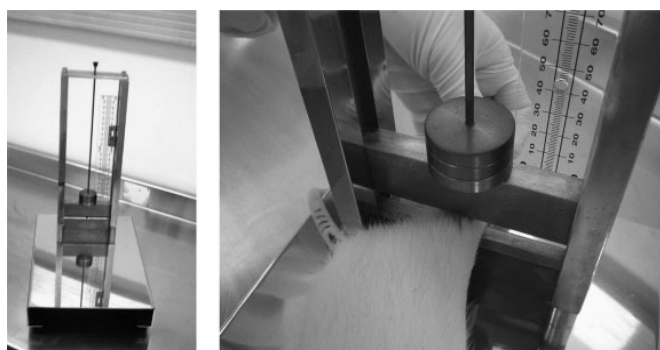
Todos os experimentos foram conduzidos em acordo com os princípios e procedimentos de cuidado com o uso de animais experimentais e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Os animais foram mantidos em ciclos de luz artificial de 12 horas claro e 12 horas escuro e alocados em gaiolas coletivas com quatro animais cada. Os animais tiveram livre acesso a água e a ração padrão para roedores. Aleatoriamente, os ratos Wistar, pesando aproximadamente 250 gramas, foram divididos em 6 grupos: Grupo 1: Sham (Músculo sem lesão); Grupo 2: Lesão muscular sem tratamento; Grupo 3: Lesão muscular e tratamento com gel salina (0.9%); Grupo 4: Lesão muscular e tratamento com gel DMSO (15 mg/kg); (grupo 3 e 4 a aplicação ocorreu de forma tópica); Grupo 5: Lesão muscular e tratamento com USP (0.8 W/cm²) e gel salina (0.9%); Grupo 6: Lesão muscular e tratamento com USP (0.8 W/cm²) e gel DMSO (15 mg/kg). Tanto as concentrações de DMSO quanto a intensidade do USP foram testadas e publicadas anteriormente⁽¹¹⁾.

Protocolo de lesão muscular

O modelo de trauma muscular foi desenvolvido de acordo com Rizzi e colaboradores (2006). Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (20mg/kg) e a lesão no gastrocnêmio realizada por um único impacto por trauma direto de uma prensa desenvolvida pelo Centro Industrial de Equipamentos de Ensino e Pesquisa (CIDEP/RS, Brasil). A lesão foi produzida por deslocamento de uma massa metálica (0.459 Kg) através de uma guia com 18 cm de altura. O impacto produziu uma energia cinética de 0,811 Joules, conforme especificações do equipamento ilustrado abaixo

(Figura 1). Para assegurar a correta padronização, os animais controles (Sham) foram anestesiados e expostos ao equipamento, porém sem que ocorresse o trauma muscular.

Figura 1. Foto ilustrativa do equipamento para trauma muscular usada no presente estudo (CIDEP, RS, Brasil).



Fonte: LASICOM.

Tratamento

O tratamento com ultra-som pulsado (Imbramed, Amparo, SP) foi de 6 minutos de duração, frequência de 1.0 MHz, intensidade de 0.8 W/cm^2 , área de radiação efetiva [ERA] 1 cm^2 e foi aplicado em 2, 12, 24 e 48 horas. A área tratada com USP foi de aproximadamente 2 cm de acordo com Rizzi et al. (2006). O gel foi preparado adicionando DMSO em salina (DMSO+Sal). O gel foi colocado no cabeçote do ultra-som e aplicado na região lesionada. O movimento do cabeçote foi circular de acordo com Saliba e colaboradores⁽¹²⁾. Após 1 (uma) hora da última aplicação os animais foram eutanasiados por decapitação e o tecido muscular

ao redor da lesão removido cirurgicamente⁽¹³⁾. As amostras foram imediatamente homogeneizadas para análises por Western blot.

Extração do tecido:

Após 1 hora da última aplicação os animais foram decapitados e o tecido muscular ao redor da lesão removido cirurgicamente e imediatamente homogeneizados em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. Ao final da extração foi adicionado Triton X-100 10% em todas as amostras e mantidas em gelo. O homogeneizado foi então centrifugado a 11.000 rpm por 40 minutos a 4°C, para remover o material insolúvel. Do sobrenadante uma parte foi utilizada para determinar a concentração protéica de cada amostra pelo método colorimétrico de biureto⁽¹⁴⁾; na parte restante foi acrescido tampão de Laemmli⁽¹⁵⁾, DTT 200 mM (proporção de 5:1), mantido sempre a 4°C até o momento de submeter à fervura a 100°C durante 5 minutos, e posteriormente aplicados em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) para avaliação dos níveis de proteínas.

Western blot: Alíquotas contendo 250 µg de proteína por amostra foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. Na seqüência, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *Bio Rad*, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, sob refrigeração contínua por gelo. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, a temperatura ambiente,

para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos, *overnight* a 4°C. Os anticorpos utilizados foram anti-TNF α , anti-IL-1 β , anti-NF κ B, anti-p-JNK, anti-JNK e anti- β -actin provenientes da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). Após *overnight*, as membranas foram incubadas em solução com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (detecção pela técnica de quimioluminescência), durante 2 horas à temperatura ambiente. Após, as membranas foram incubadas por dois minutos em substrato enzimático e expostas ao filme de RX em cassete de revelação autoradiográfica com uso de revelador e fixador radiográfico. A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autoradiografias por densitometria ótica, utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation).

Análise estatística: Os dados foram expressos como média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste post hoc Tukey utilizando-se para isso o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 12.0 como pacote estatístico. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Lesão muscular traumática aumenta e a terapia do ultra-som associado a gel DMSO reduzem os níveis protéicos de TNF α , IL-1 β , fosforilação da JNK e NF κ B em gastrocnêmio de ratos.

O tecido muscular é um dos poucos que pode regenerar após trauma devido sua regulação do balanço de crescimento, fusão e diferenciação de células precursoras (mioblastos). Em adição, uma das alterações marcantes na lesão muscular é o grau de

ativação inflamatória tecidual. Como esperado, foi marcante o aumento dos níveis protéicos de $TNF\alpha$ no grupo submetido à lesão muscular (4,9 vezes) quando comparado ao grupo sham (Fig. 2A). O uso tópico de salina, gel DMSO ou mesmo ultra-som associado a gel salina não alterou os níveis protéicos de $TNF\alpha$. No entanto, o uso associado de ultra-som pulsado com DMSO resultou em significativa redução (2,2 vezes) dos níveis de $TNF\alpha$ (Fig. 2A). Outra importante, e bem estudada citocina, é a $IL-1\beta$. Neste sentido, avaliamos, também, a $IL-1\beta$. A figura 2B mostra que a lesão muscular aumentou os níveis protéicos de $IL-1\beta$ em 3,6 vezes quando comparado ao grupo sham (Fig. 2B). O uso tópico de salina, gel DMSO ou mesmo ultra-som associado a gel salina não alterou os níveis protéicos de $IL-1\beta$. No entanto, o uso associado de ultra-som pulsado com DMSO resultou em significativa redução (2,1 vezes) dos níveis de $IL-1\beta$ (Fig. 2B). A redução dessas duas citocinas nos permite sugerir menor quadro inflamatório após terapia do ultra-som associado a gel DMSO.

Agindo através de seus receptores, as citocinas ativam vias intracelulares como a via IKK/NF κ B e a MAP quinase/JNK. Dessa forma, achamos importante avaliar os níveis protéicos de NF κ B e JNK. A fosforilação da JNK aumentou no grupo com lesão muscular (4,2 vezes) quando comparado ao grupo sham (Fig. 2C). Os grupos salina, gel DMSO e ultra-som associado a gel salina não alteraram a fosforilação da JNK (Fig. 2C). A aplicação de ultra-som pulsado associado a gel DMSO resultou em significativa redução (2,4 vezes) dos níveis da fosforilação de JNK (Fig. 2C). Similarmente aos níveis das citocinas, os níveis de NF κ B aumentaram no grupo com lesão muscular (3,8 vezes) quando comparado ao grupo sham. Também, similar aos resultados anteriores, o uso de ultra-som associado a gel DMSO reduziu (2,1 vezes) os níveis de NF κ B quando comparado ao grupo lesão (Fig. 2D). Não foi observada diferença significativa nos grupos salina, gel DMSO e ultra-som associado a gel salina quando comparado ao grupo lesão (Fig. 2D).

DISCUSSÃO

O grande aumento na incidência de lesões musculares, seja em sportistas, seja em atividades cotidianas, resulta na necessidade de maiores conhecimentos acerca das intervenções fisioterapêuticas. No entanto, a efetividade da regeneração pode ser reduzida devido à terapia aplicada e ao tempo da intervenção (para revisão ver 16). Em adição, sabe-se que o processo inflamatório é marcante e que esta ocorrência pode resultar em menor eficiência de terapias para o reparo do músculo (para revisão ver 16). Com essa preocupação, o presente estudo procurou avaliar os níveis protéicos de moléculas pró-inflamatória após lesão muscular traumática e se o uso da terapia do ultra-som pulsado associado a gel DMSO modularia tais moléculas.

A inflamação é um processo gerado pelo sistema imune, frente agressões de diversas naturezas, como infecção ou dano tecidual, onde se inicia a ativação de componentes celulares específicos, com participação de citocinas (ex.: $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$), enzimas ($COX-2$, $iNOS$ e JNK) e fatores de transcrição relacionados a resposta inflamatória ($NFkB$), na tentativa de restaurar a homeostase celular, levando à mudanças fisiológicas em grande escala⁽¹⁷⁾. Entretanto, é um processo que pode ser extremamente deletério, causando destruição tecidual, por exemplo, quando a resposta é exacerbada ou sua duração se estende por longos períodos.

Dentre as citocinas o $TNF\alpha$ e a $IL-1\beta$ parecem estar relacionados à lesão muscular induzidas por diversos tipos de traumas⁽⁵⁾. $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ são as principais citocinas que cumprem o papel primário de mediar a ativação de elementos do sistema imune participantes da resposta ao agente ou mecanismo agressor⁽⁶⁾. No presente estudo podemos observar aumento dos níveis protéicos de $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ após lesão muscular traumática. Na Figura 2 A e 2B, pode-se observar aumento marcante nos níveis protéicos dessas citocinas. A relação

da inflamação para o reparo de lesão muscular tem sido pouco estudada, mas acredita-se que esses mediadores inflamatórios estão envolvidos neste processo⁽¹⁷⁾. Acredita-se que as citocinas pró-inflamatórias regulam a adesão de moléculas intercelulares requeridas no fluxo de neutrófilos e macrófagos. Macrófagos liberam citocinas envolvidas na quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células satélites necessárias para o reparo tecidual.

O TNF α é um importante produto do macrófago ativado, como também um mediador de diversas funções em tecido inflamado e lesionado. Agindo através de TNFR1 (receptor 1 de TNF α), o TNF α ativa substratos intracelulares que participam do controle da transcrição de genes de resposta inflamatória, modula proteínas participantes do controle de apoptose e regula respostas de crescimento e diferenciação celular. Um dos principais substratos intermediários da via de sinalização do TNF α é a serina quinase JNK. Uma vez ativada, a JNK tem a função primária de induzir a associação dos produtos dos genes de resposta imediata c-Jun e c-Fos, levando à formação do fator de transcrição dimérico AP-1, levando à transcrição de genes que levarão à síntese de proteínas importantes no equilíbrio celular⁽¹⁸⁾. Os resultados mostram que a lesão muscular aumenta a fosforilação da JNK (Fig. 2C). Outra via pró-inflamatória é a via IKK/I κ B/NF κ B. Esta via pode ser ativada pelo TNF α , mas também por outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1. A IKK é uma proteína quinase que estimula a ativação do fator de transcrição NF κ B. No entanto, na ausência dos estímulos inflamatórios, a IKK fica inativa, impedindo a ação de NF κ B. Outra quinase é a responsável pela inibição de IKK: a I κ B. Quando os estímulos adequados se iniciam, I κ B é inativado, agora permitindo a ação de IKK e ativação do NF κ B, gerando a transcrição de genes de outras proteínas pró-inflamatórias, genes das citocinas, por citar algumas⁽¹⁹⁾. Os resultados do presente estudo mostram que a lesão muscular aumenta a os níveis protéicos de NF κ B (Fig. 2D) de forma similar aos níveis protéicos das citocinas.

Na Fisioterapia, a terapia ultra-sônica é utilizada no tratamento de pequenas lesões musculares, acelerando o processo de cicatrização muscular⁽²⁰⁾. Dentro deste contexto, a terapia com ultra-som pulsado (USP) é comumente usada por produzir mudanças na permeabilidade de membrana e estimular o transporte de substâncias de mensageiros secundários, como cálcio⁽⁷⁾. Estes segundos mensageiros podem estimular a proliferação de células, que no caso do músculo esquelético, células satélites^(21,22). Os resultados do presente estudo mostram que a redução nos marcadores inflamatórios após uso do ultra-som isolado não foram estatisticamente significantes (Fig. 2A, B, C e D)

O uso isolado do ultra-som acelera a recuperação de danos musculares, mas esse efeito pode ser potencializado com agentes farmacológicos. Desse modo, o uso combinado do ultra-som e agentes antiinflamatórios, como o DMSO, pode representar uma importante alternativa no tratamento de lesões musculares. O DMSO é usado em estudos com músculo esquelético como um potente antioxidante ou como solvente para várias drogas⁽¹⁰⁾. De acordo com Camici e colaboradores⁽¹⁰⁾ o DMSO também é usado por suas características antiinflamatórias e tem sido usado com sucesso em humanos em alguns tratamentos. Muitas propriedades farmacológicas e terapêuticas, já verificadas, resultam da sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e vários fármacos sem alterar, de forma irreversível, a configuração molecular⁽²³⁾. Devido às propriedades antiinflamatórias do DMSO hipotetizamos que sua aplicação na lesão muscular em conjunto com ultra-som pulsado poderia reduzir os níveis protéicos da via pró-inflamatória. Os resultados demonstram significativa redução nos níveis protéicos de TNF α , IL-1 β , fosforilação da JNK e níveis de NFkB (Figs. 2A, B, C e D; respectivamente). Nossos resultados são limitados quanto a ampliação de novas técnicas, como histologia por citar

alguma. No entanto, são interessantes a medida que estudos acerca do uso de ultra-som pulsado associado a gel DMSO inexistem.

O presente estudo demonstra que a lesão muscular robustamente aumenta citocinas pró-inflamatórias e sua via de sinalização intracelular, como a via do NFkB e a JNK e que o uso de ultra-som pulsado associado a gel DMSO reverteu tal aumento. Estes achados sugerem que a via pró-inflamatória está envolvida na resposta à lesão muscular e, possivelmente, no processo da regeneração muscular. Nossos resultados demonstram que o uso de ultra-som associado a gel DMSO torna o tratamento da lesão muscular mais efetivo no que diz respeito a via inflamatória, quando comparado ao uso do ultra-som, somente. Estudos adicionais são necessários para avaliar se esse tratamento reduz diretamente a inflamação ou se isso ocorreu devido aos efeitos antioxidantes do DMSO, uma vez que se sabe que as espécies reativas de oxigênio ativam NFkB. Por último, em estudos futuros seria interessante esclarecer a função precisa da resposta inflamatória no processo de degeneração e regeneração muscular.

REFERÊNCIAS

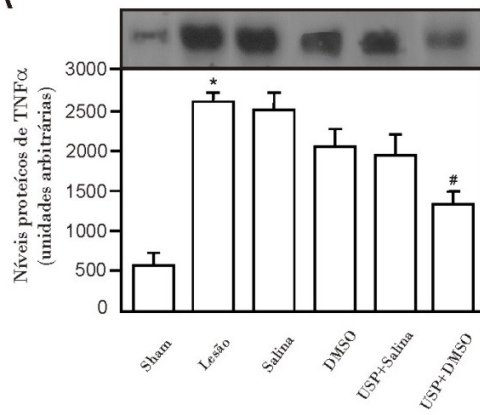
1. Fukushima K, Badlani N, Usas A, Riano F, Fu F, Huard J. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am. J Sports Med.* 2001;29(4):394-402.
2. Amaral AC, Parizotto NA, Salvini TF. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration os skeletal muscle in mice. *Lasers Med. Sci.* 2001;16(1):44-51.
3. Lim JY, Han TR. Effect of electromyostimulation on apoptosis-related factors in denervation and reinnervation of rat skeletal muscles. *Muscle Nerve.* 2010;42(3):422-30.
4. Anderson JE, Mitchell CM, Mcgeachie J K, Grouds MD. The time course of basic fibroblast growth factor expression in crush-injured skeletal muscles of SJL/J and BALB/c mice. *Exp Cell Res.* 1995;216(2):325-334.
5. Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298(5):R1173-87.
6. Gupta S. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J Clin Immunol.* 2002;22(4):185-194.
7. Wilkin LD, Merrick MA, Kirby TE, Devor ST. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *Int J Sports Med.* 2004;25(1):73-77.

8. Hill GE, Fenwick S, Matthews BJ, Chivers RA, Southgate J. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31(12):1701-6.
9. Velasco R, Trujillo X, Vásquez C, Huerta M, Trujillo-Hernández B. Effect of dimethyl sulfoxide on excitation-contraction coupling in chicken slow skeletal muscle. *J Pharmacol Sci.* 2003;93(2):149-54.
10. Camici GG, Steffel J, Akhmedov A, Schafer N, Baldinger J, Schulz U, et al. Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation: a potential treatment strategy for drug-eluting stents. *Circulation.* 2006;114(14):1512-21.
11. Silveira PC, Victor EG, Schefer D, Silva LA, Streck EL, Paula MM et al. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. *Ultrasound Med Biol.* 2010;36(1):44-50.
12. Saliba S, Mistry DJ, Perrin DH, Gieck J, Weltman A. Phonophoresis and the absorption of dexamethasone in the presence of an occlusive dressing. *J Athl Train.* 2007;42(3):349-54.
13. Freitas LS, Freitas TP, Silveira PC, Rocha LG, Pinho RA, Streck EL. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. *Cell Biol Int.* 2007;31(5):482-8.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–254.
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680–685.
16. Iimuro Y, Fujimoto J. TLRs, NF- κ B, JNK, and Liver Regeneration. *Gastroenterol Res Pract.* 2010; pii: 598109.

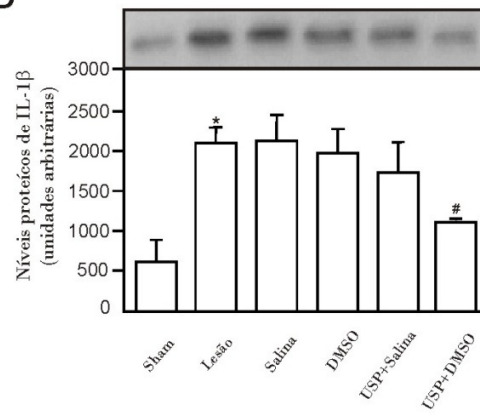
17. Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinstry M, Mishra M, Luster MI, et al. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J.* 2002;16(12):1630-2.
18. Katoh M, Katoh M. AP1- and NF-kappaB-binding sites conserved among mammalian WNT10B orthologs elucidate the TNFalpha-WNT10B signaling loop implicated in carcinogenesis and adipogenesis. *Int J Mol Med.* 2007;19(4):699-703.
19. Brodsky M, Halpert G, Albeck M, Sredni B. The anti-inflammatory effects of the tellurium redox modulating compound, AS101, are associated with regulation of NFkappaB signaling pathway and nitric oxide induction in macrophages. *J Inflamm (Lond).* 2010;7(1):3.
20. Barnett SB, Ter Haar GR, Ziskin MC, Rott HD, Duck FA, Maeda K. International recommendations and guidelines for the safe use of diagnostic ultrasound in medicine. *Ultrasound Med Biol.* 2000;26(3):355-66.
21. Karnes JL, Burton HW. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. *Arch Phys Med Rehabil* 2002;83(1):1-4.
22. Markert CD. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil* 2005;86(7):1304–1310.
23. Rubin LF. Toxicologic update of dimethyl sulfoxide. *Ann N Y Acad Sci.* 1983;411:6-10.

Fig 2. Expressão de $TNF\alpha$, e $IL-1\beta$, fosforilação da JNK e NFkB em músculo gastrocnêmio após lesão por trauma e tratamento com ultra-som pulsado e DMSO. Após trauma muscular os animais foram submetidos a tratamento com ultra-som e DMSO por 0 (Sham); 2; 12; 24 e 48 horas e o tecido lesionado extraído e analisado conforme materiais e métodos. Expressão tecidual de $TNF\alpha$, expressão de $IL-1\beta$ (**B**); expressão da fosforilação de JNK (**C**) e expressão de NFkB (**D**). Os resultados são apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média, em unidades arbitrárias e o tamanho amostral foi de oito ratos por grupos ($n = 8$). * $p < 0,05$, diferença significativa quando comparado grupo lesão versus sham, e # $p < 0,05$, diferença significativa quando comparado grupo USP+DMSO versus lesão.

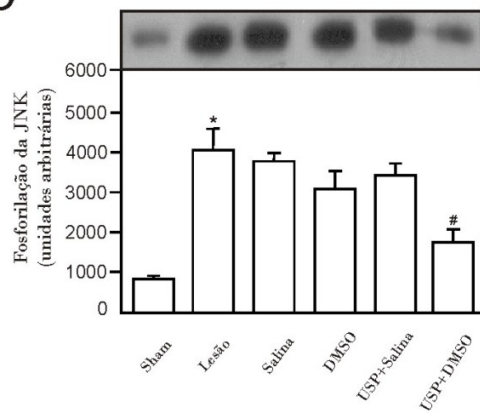
A



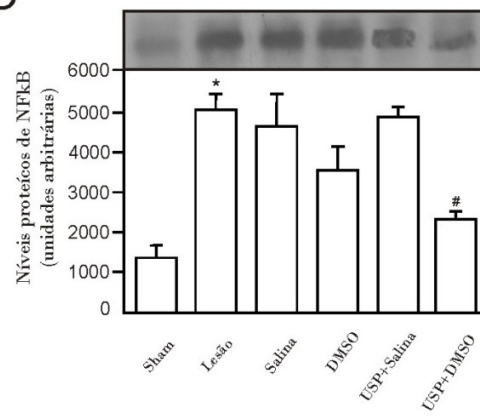
B



C



D



ANEXO

Capítulo III – Normas de Publicação da Revista

Revista Brasileira de Medicina do Esporte

A **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** (RBME) é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte (SBME), com publicação bimestral. A missão da RBME é disseminar a produção científica nas áreas de ciências do exercício e do esporte, através da publicação de resultados de pesquisas originais e de outras formas de documentos que contribuam para o conhecimento fundamental e aplicado em atividade física, exercício e esporte no âmbito das ciências biológicas e da medicina.

Serão considerados para publicação artigos originais, artigos de opinião, artigos de revisão, relatos de experiência, relatos de casos ou cartas ao editor, sobre assuntos relacionados com as áreas de Medicina e Ciências do Exercício e do Esporte. Ser membro da SBME não representa um pré-requisito para publicação na RBME, nem influencia a decisão do Conselho Editorial. Serão aceitos artigos escritos na língua portuguesa e, a critério do Conselho Editorial, autores e grupos estrangeiros poderão publicar artigos escritos em inglês. Todos os artigos serão publicados na íntegra em português e em inglês, com resumos também em espanhol, sendo responsabilidade da RBME a produção das versões estrangeiras.

A RBME adota as regras de preparação de manuscritos da *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (International Committee of Medical Journal Editors).

Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47), cuja última atualização realizada em outubro de 2001 está disponível na internet (<http://www.icmje.org>).

DUPLA SUBMISSÃO

Os artigos submetidos à RBME serão considerados para publicação somente com a condição de que não tenham sido publicados ou estejam em processo de avaliação para publicação em outro periódico, seja na sua versão integral ou em parte. A RBME não considerará para publicação artigos cujos dados tenham sido disponibilizados na Internet para acesso público.

Se houver no artigo submetido algum material em figuras ou tabelas já publicado em outro local, a submissão do artigo deverá ser acompanhada de cópia do material original e da permissão por escrito para reprodução do material.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores deverão explicitar, através de formulário próprio (Divulgação de potencial conflito de interesses - a seguir), qualquer potencial conflito de interesse relacionado ao artigo submetido, conforme determinação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC 102/ 2000) e do Conselho Federal de Medicina (Resolução nº 1.595/2000). Esta exigência visa informar os editores, revisores e leitores sobre relações profissionais e/ou financeiras (como patrocínios e participação societária) com agentes financeiros relacionados aos produtos farmacêuticos ou equipamentos envolvidos no trabalho, os quais podem teoricamente influenciar as interpretações e conclusões do mesmo. A existência ou não de conflito de interesse declarado estarão ao final de todos os artigos publicados.

BIOÉTICA DE EXPERIMENTOS COM SERES HUMANOS

A realização de experimentos envolvendo seres humanos deve seguir a resolução específica do Conselho Nacional de Saúde (nº 196/96) disponível na internet (<http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Reso196de96.doc>), incluindo a assinatura de um termo de consentimento informado e a proteção da privacidade dos voluntários.

BIOÉTICA DE EXPERIMENTOS COM ANIMAIS

A realização de experimentos envolvendo animais deve seguir resoluções específicas (Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979; e Decreto nº 24.645 de 10 de julho de 1934).

ENSAIOS CLÍNICOS

Os artigos contendo resultados de ensaios clínicos deverão disponibilizar todas as informações necessárias à sua adequada avaliação, conforme previamente estabelecido. Os autores deverão referir-se ao "CONSORT" (www.consort-statement.org).

REVISÃO PELOS PARES

Todos os artigos submetidos serão avaliados por ao menos dois revisores com experiência e competência profissional na respectiva área do trabalho e que emitirão parecer fundamentado, os quais serão utilizados pelos Editores para decidir sobre a aceitação do mesmo. Os critérios de avaliação dos artigos incluem: originalidade, contribuição para corpo de conhecimento da área, adequação metodológica, clareza e atualidade. Os artigos aceitos para publicação poderão sofrer revisões editoriais para facilitar sua clareza e entendimento sem alterar seu conteúdo.

CORREÇÃO DE PROVAS GRÁFICAS

Logo que prontas, as provas gráficas em formato eletrônico serão enviadas, por e-mail, para o autor responsável pelo artigo. Os autores deverão devolver a prova gráfica com as devidas correções em, no máximo, 48 horas após o seu recebimento.

DIREITOS AUTORAIS

Todas as declarações publicadas nos artigos são de inteira responsabilidade dos autores. Entretanto, todo material publicado torna-se propriedade da Editora, que passa a reservar os direitos autorais. Portanto, nenhum material publicado na RBME poderá ser reproduzido sem a permissão por escrito da Editora. Todos os autores de artigos submetidos à RBME deverão assinar um Termo de Transferência de Direitos Autorais (a seguir), que entrará em vigor a partir da data de aceite do trabalho. O autor responsável pelo artigo receberá, sem custos, a separata eletrônica da publicação (em formato PDF).

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Prof. Dr. Antonio Claudio Lucas da Nóbrega
Editor-Chefe da Revista Brasileira de Medicina do Esporte
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Instituto Biomédico
Universidade Federal Fluminense
Rua Prof. Hernani Pires de Melo 101, São Domingos
Niterói, RJ - CEP 24210-130
E-mail: revista@medicinadoesporte.com.br

INSTRUÇÕES PARA ENVIO

Todos os artigos deverão ser submetidos diretamente em nosso site (www.rbme.org.br) e não deverão ultrapassar 20 páginas em seu total. Após submissão eletrônica do artigo, os autores deverão enviar, por correio: * Termo de Divulgação de Potencial Conflito de Interesses (conforme modelo a seguir). * Termo de Transferência de Direitos Autorais (conforme modelo a seguir). O artigo submetido deve ser digitado em espaço duplo, papel tamanho A4, com margens de 2,5 cm e espaço 1,5, sem numerar linhas ou parágrafos, e numerando as páginas no canto superior direito; as legendas das figuras e as tabelas devem vir ao final do texto, no mesmo arquivo. Figuras devem ser incluídas em arquivos individuais. Os

manuscritos que não estiverem de acordo com as instruções a seguir em relação ao estilo e formato serão devolvidos sem revisão pelo Conselho Editorial.

FORMATO DOS ARQUIVOS

- Para o texto, usar editor de texto do tipo Microsoft Word para Windows ou equivalente
- As figuras deverão estar nos formatos jpg ou tif.

Forma e preparação de manuscritos

ARTIGO ORIGINAL

Um artigo original deve conter no máximo 20 (vinte) páginas conforme formato acima (incluindo referências, figuras e tabelas) e ser estruturado com os seguintes itens, cada um começando por uma página diferente:

Página título: deve conter (1) o título do artigo, que deve ser objetivo, mas informativo; (2) nomes completos dos autores; instituição(ões) de origem, com cidade, estado e país, se fora do Brasil; (3) nome do autor correspondente, com endereço completo e e-mail.

Resumo: deve conter (1) o resumo em português, com não mais do que 300 palavras, estruturado de forma a conter: introdução e objetivo, métodos, resultados e conclusão; (2) três a cinco palavras-chave, que não constem no título do artigo. Usar obrigatoriamente termos do Medical Subject Headings, do Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) (3) o resumo em inglês (abstract), representando tradução do resumo para a língua inglesa (4) três a cinco palavras-chave em inglês (keywords).

Introdução: deve conter (1) justificativa objetiva para o estudo, com referências pertinentes ao assunto, sem realizar uma revisão extensa; (2) objetivo do artigo.

Métodos: deve conter (1) descrição clara da amostra utilizada; (2) termo de consentimento para estudos experimentais envolvendo humanos; (3) identificação dos métodos, aparelhos (fabricantes e endereço entre parênteses) e procedimentos utilizados de modo suficientemente detalhado, de forma a permitir a reprodução dos resultados pelos leitores; (4) descrição breve e referências de métodos publicados, mas não amplamente conhecidos; (5) descrição de métodos novos ou modificações (6) quando pertinente, incluir a análise estatística utilizada, bem como os procedimentos utilizados. No texto, números menores que 10 são escritos por extenso, enquanto que números de 10 em diante são expressos em algarismos arábicos.

Resultados: deve conter (1) apresentação dos resultados em seqüência lógica, em forma de texto, tabelas e ilustrações; evitar repetição excessiva de dados em tabelas ou ilustrações e no texto; (2) enfatizar somente observações importantes.

Discussão: deve conter (1) ênfase nos aspectos originais e importantes do estudo evitando repetir em detalhes dados já apresentados na Introdução e nos Resultados (2) relevância e limitações dos achados, confrontando com os dados da literatura incluindo implicações para futuros estudos; (3) ligação das conclusões com os objetivos do estudo; (4) conclusões que podem ser tiradas a partir do estudo; recomendações podem ser incluídas, quando relevantes.

Agradecimentos: deve conter (1) contribuições que justificam agradecimentos, mas não autoria; (2) fontes de financiamento e apoio de uma forma geral.

Referências: as referências bibliográficas devem ser numeradas na sequência e que aparecem no texto. As referências citadas somente em legendas de tabelas e figuras devem ser numeradas de acordo com uma seqüência estabelecida pela primeira menção da tabela ou da figura no texto.

O estilo das referências bibliográficas deve seguir as regras do Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47; <http://www.icmje.org>). Alguns exemplos mais comuns são mostrados abaixo. Para os casos não mostrados aqui, consultar a referência acima. Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o Index Medicus (List of Journals Index <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>). Se o periódico não constar dessa lista, colocar o nome por extenso. Deve-se evitar utilizar "comunicações pessoais" ou "observações não publicadas" como referências. Um resumo apresentado deve ser utilizado somente se for a única fonte de informação.

Exemplos:

- 1) Artigo padrão em periódico (deve-se listar todos os autores; se o número ultrapassar seis, colocar os seis primeiros, seguidos por et al): You CH, Lee KY, Chey RY, Mrnguy R. Electrocardiographic study of patients with unexplained nausea, bloating and vomiting. *Gastroenterology* 1980;79:311-4. Goate AM, Haynes AR, Owen MJ, Farrall M, James LA, Lai LY, et al. Predisposing locus Alzheimer's disease on chromosome 21. *Lancet* 1989;1:352-5.
- 2) Autor institucional: The Royal Marsden Hospital Bone-Marrow Transplant Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977;2:742-4.
- 3) Livro com autor(es) responsáveis por todo o conteúdo: Colson JH, Armour V. *Sports injuries and their treatment*. 2nd rev. ed. London: S. Paul, 1986.
- 4) Livro com editor(es) como autor(es): Diener HC, Wilkinson M, editors. *Drug induced headache*. New York: Springer-Verlag, 1988.
- 5) Capítulo de livro: Weinstein L, Swartz MN. Pathologic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editors. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: Saunders, 1974;457-72.

TABELAS

As tabelas devem ser elaboradas em espaço 1,5, devendo ser planejadas para ter como largura uma (8,7cm) ou duas colunas (18cm). Cada tabela deve possuir um título sucinto; itens explicativos devem estar ao pé da tabela. A tabela deve conter médias e medidas de dispersão (DP, EPM, etc.), não devendo conter casas decimais irrelevantes. As abreviaturas devem estar de acordo com as utilizadas no texto e nas figuras. Os códigos de identificação de itens da tabela devem estar listados na ordem de surgimento no sentido horizontal e devem ser identificados pelos símbolos padrão.

FIGURAS

Serão aceitas fotos ou figuras em preto-e-branco. Figuras coloridas poderão ser publicadas quando forem essenciais para o conteúdo científico do artigo. Nestes casos, os custos serão arcados pelos autores. Para detalhes sobre ilustrações coloridas, solicitamos contactar diretamente a Editora Redprint

(redprint@uol.com.br). Figuras coloridas poderão ser incluídas na versão eletrônica do artigo sem custo adicional para os autores. Os desenhos das figuras devem ser consistentes e tão simples quanto possível. Não utilizar tons de cinza. Todas as linhas devem ser sólidas. Para gráficos de barra, por exemplo, utilizar barras brancas, pretas, com linhas diagonais nas duas direções, linhas em xadrez, linha horizontais e verticais. A RBME desestimula fortemente o envio de fotografias de equipamentos e animais. As figuras devem ser impressas com bom contraste e largura de uma coluna (8,7cm) no total. Utilizar fontes de no mínimo 10 pontos, letras, números e símbolos, com espaçamento e alinhamento adequados. Quando a figura representar uma radiografia ou fotografia sugerimos incluir a escala de tamanho quando pertinente.

ARTIGOS DE REVISÃO

Os artigos de revisão são habitualmente encomendados pelo Editor a autores com experiência comprovada na área. A RBME encoraja, entretanto, que se envie material não encomendado, desde que expresse a experiência publicada do(a) autor(a) e não reflita, apenas, uma revisão da literatura. Artigos de revisão devem abordar temas específicos com o objetivo de atualizar os menos familiarizados assuntos, tópicos ou questões específicas nas áreas de Medicina e Ciências do Exercício e do Esporte. O Conselho Editorial avaliará a qualidade do artigo, a relevância do tema escolhido e o comprovado destaque dos autores na área específica abordada.

ARTIGOS DE OPINIÃO

Serão encomendados pelo Conselho Editorial a indivíduos de notório saber nas áreas de Medicina do Exercício e do Esporte e das Ciências do Esporte, que emitirão sua opinião pessoal sobre assuntos de particular interesse.

RELATOS DE EXPERIÊNCIA

A RBME estimula profissionais que possuam uma experiência relevante em algum aspecto especial, original ou inovador em Medicina do Exercício e do Esporte e das Ciências do Esporte a partilhá-la, sob a forma de um Relato de Experiência.

RELATO DE CASO

A RBME estimula autores a submeter artigos de relato de caso, descrevendo casos clínicos específicos que tragam informações relevantes e ilustrativas sobre diagnóstico ou tratamento de um caso particular que seja raro na Medicina do Exercício e do Esporte. Os artigos devem ser objetivos e precisos, contendo os seguintes itens: 1) Um Resumo e um Abstract contendo as implicações clínicas. Uma Introdução com comentários sobre o problema clínico que será abordado, utilizando o caso como exemplo. É importante documentar a concordância do paciente em utilizar os seus dados clínicos; 3) Um Relato objetivo contendo a história, o exame físico e os achados de exames complementares, bem como o tratamento e o acompanhamento; 4) Uma Discussão explicando em detalhes as implicações clínicas do caso em questão, e confrontando com dados da literatura incluindo casos semelhantes relatados na literatura; 5) Referências bibliográficas.

CARTA AO EDITOR

Cartas endereçadas ao Editor-Chefe da RBME serão consideradas para publicação se promoverem discussão intelectual sobre um determinado artigo recentemente publicado. As cartas devem conter um título informativo e seguir as instruções acima para publicação. As cartas devem ter não mais do que 500 palavras. Se aceita, uma cópia será enviada ao autor do artigo original que suscitou a discussão com um convite para submeter uma réplica que será publicada junto com a carta.

LIVROS PARA REVISÃO

A RBME estimula as editoras a submeterem livros para apreciação pelo Conselho Editorial. Devem ser enviadas duas cópias do livro ao Editor-Chefe (vide o endereço acima), as quais não serão devolvidas. O envio dos livros não garante sua apreciação. Contudo, os livros recebidos e não apreciados serão listados no último número de cada ano da Revista. Os livros selecionados para apreciação são encaminhados para revisores com experiência e competência profissional na respectiva área do livro, cujos pareceres deverão ser emitidos em até três meses poderão ser adaptados pelos Editores da Revista, sem qualquer interferência das editoras dos livros apreciados. O resultado da apreciação será publicado na Revista juntamente com as informações editoriais do livro.

Envio de manuscritos

Os autores devem enviar:

- Carta de encaminhamento assinada por todos os autores ou pelo primeiro autor em nome dos demais, contendo: 1) informação a respeito de submissão prévia ou dupla ou submissão de qualquer parte do trabalho atual; 2) uma declaração de relações, financeiras ou não, que possam levar a conflito de interesse; 3) uma declaração de que o trabalho foi lido e aprovado por todos os co-autores e que os critérios necessários para a declaração de autoria (consultar *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*) foram alcançados por todos os autores e que cada autor afirma que os dados do manuscrito são verdadeiros; 4) o nome, endereço telefone e e-mail do autor para correspondência, que será o responsável em comunicar-se com os outros autores a respeito de revisões e provas gráficas. A carta deverá dar outras informações úteis ao Editor, como a sessão a que o artigo está sendo submetido.
- Termo de Divulgação de Potencial Conflito de Interesses (conforme [modelo a seguir](#)).
- Termo de Transferência de Direitos Autorais (conforme [modelo a seguir](#)).
- Três cópias do artigo, digitadas em espaço duplo, impressas em papel tamanho A4 ou ofício em somente um dos lados, com margens de 2,5 cm e espaço 1,5, sem numerar linhas ou parágrafos, e numerando as páginas no canto superior direito; as legendas das figuras, as figuras propriamente ditas e as tabelas devem vir ao final anexas a cada cópia; assinalar no texto os locais adequados para inserção das figuras e tabelas.
- Um disquete 3,5 polegadas de alta densidade ou CD contendo

somente um arquivo de texto, correspondente ao artigo, e os arquivos correspondentes a fotos ou figuras.

Os manuscritos que não estiverem de acordo com as instruções a seguir em relação ao estilo e formato serão devolvidos sem revisão pelo Conselho Editorial.

PREPARO DO DISQUETE

- Disquete formatado compatível com IBM/PC
- Usar editor de texto (Microsoft Word para Windows ou equivalente)
- O arquivo de texto deve conter somente o texto, da página-título até as referências, e as tabelas
- As figuras não devem ser incluídas no mesmo arquivo do texto
- Certificar-se de colocar no disquete a última versão do artigo, idêntica à versão impressa
- Etiquetar o disquete informando o programa e a versão utilizados, bem como o nome do arquivo.

ENVIO DE ARTIGOS POR E-MAIL

A RBME estimula a submissão de artigos através de correio eletrônico (e-mail). Este tipo de submissão permite maior agilidade no processo de revisão. Para isso, será necessário o envio dos arquivos contendo o texto e as figuras do artigo para o endereço eletrônico da revista (revista@medicinadoesporte.com.br).

Deverá ser enviada uma mensagem ao Editor-Chefe com identificação dos autores, bem como os seus endereços convencional e eletrônico, mais informações sobre o formato utilizado. O artigo deverá ser enviado em anexo (como attachment), nos formatos MS Word para Windows, respeitando rigorosamente as normas abaixo. As figuras deverão estar nos formatos jpg ou tif.

O Termo de Transferência de Direitos Autorais dos artigos submetidos por e-mail deverão ser enviados via correio convencional e sua data de postagem não deverá ultrapassar em dez dias a data de submissão eletrônica do artigo.