

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE

CURSO DE FISIOTERAPIA

GUILHERME LAURENTINA DA ROSA

**RESPOSTA DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO PULSADO (UTP), ATRAVÉS DA
FONOFORESE DE DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) E NANOPARTÍCULAS DE
OURO NA REVERSÃO DOS DANOS OXIDATIVOS EM QUADRÍCEPS DE RATOS
INDUZIDOS À LESÃO POR EXERCÍCIO EXCÊNTRICO**

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2011

GUILHERME LAURENTINA DA ROSA

**RESPOSTA DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO PULSADO (UTP), ATRAVÉS DA
FONOFORESE DE DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) E NANOPARTÍCULAS DE
OURO NA REVERSÃO DOS DANOS OXIDATIVOS EM QUADRÍCEPS DE RATOS
INDUZIDOS À LESÃO POR EXERCÍCIO EXCÊNTRICO**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado para obtenção do grau de
Fisioterapeuta no curso de Fisioterapia da
Universidade do Extremo Sul Catarinense,
UNESC.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Aurino Pinho

Coorientador: Prof. Ms. Eduardo Ghise Victor

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2011

Guilherme Laurentina da Rosa

RESPOSTA DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO NA FORMA PULSADA,
DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) FONOFORESE E DE NANO PARTÍCULAS DE
OURO NA REVERSÃO DOS DANOS OXIDATIVOS EM QUADRÍCEPS DE RATOS
INDUZIDOS À LESÃO POR EXERCÍCIO EXCÊNTRICO

Criciúma, Novembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Ricardo A. de Pinho

Representado por: *Talita Tuon*

1^º(a) Examinador (a): *Priscila Soares de Souza*

2^º(a) Examinador (a): *Barbara Coelho*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente dedico este trabalho a **Deus**, que me deu forças e iluminou meu caminho;

Aos meus pais, **Mariléia e Luiz Carlos** que não mediram esforços para que eu realizasse essa conquista;

Aos meus avós: **Ivone, Manoel, Carmen e José**;

Aos meus **tios** que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida, mas em especial ao tio **Ricardo** que foi sempre um ombro amigo nos momentos difíceis;

À todos os meus amigos, em especial ao **Evandro, Uillian, Muriel, Fernando J, Fernando M, Josias e Miguel** que estiveram durante esses 5 anos ao meu lado compartilhando alegrias, tristezas, desafios e conquistas;

Aos grupos **LAFIBE e LASICON** e ao meu orientador **Ricardo** que me oportunizou a vivência dentro da pesquisa.

A todos, meu sincero Muito Obrigado!

**“É graça divina começar bem.
Graça maior persistir na
caminhada certa. Mas graça das
graças é não desistir nunca”.**

Dom Hélder Câmara

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – PROJETO DE PESQUISA	07
CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO	39
CAPÍTULO III – NORMAS DA REVISTA	40

CAPÍTULO I – PROJETO DE PESQUISA

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE

GUILHERME LAURENTINA DA ROSA

**RESPOSTA DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO NA FORMA PULSADA,
DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) FONOFORESE E DE NANO PARTÍCULAS DE
OURO NA REVERSÃO DOS DANOS OXIDATIVOS EM QUADRÍCEPS DE RATOS
INDUZIDOS À LESÃO POR EXERCÍCIO EXCÊNTRICO**

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2011
GUILHERME LAURENTINA DA ROSA

**RESPOSTA DO ULTRA-SOM TERAPÊUTICO NA FORMA PULSADA,
DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) FONOFORESE E DE NANO PARTÍCULAS DE
OURO NA REVERSÃO DOS DANOS OXIDATIVOS EM QUADRÍCEPS DE RATOS
INDUZIDOS À LESÃO POR EXERCÍCIO EXCÊNTRICO**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado para obtenção do grau de
Fisioterapeuta no curso de Fisioterapia da
Universidade do Extremo Sul Catarinense,
UNESC.

Orientador: Prof. MSc. Dr. Ricardo Aurino
Pinho

Coorientador: Prof. Ms. Eduardo Ghise Victor

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2011

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. A atividade da CKu/l em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.....	52
Figura 2. Níveis de produção de superóxido em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.....	53
Figura 3. Níveis de TBARS em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.....	53
Figura 4. Níveis de carbonilação de proteínas em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.....	54
Figura 5. Atividade da superóxido dismutase (SOD) em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.....	55
Figura 6. Atividade da catalase em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.....	56
Figura 7. Ativação da glutathiona peroxidase em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.....	57

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

a.C – Antes de Cristo

AMP – Adenosina Monofosfato

AuN – Nanopartículas de Ouro

CA – Correntes Alternadas

Ca⁺⁺ - Cálcio

CAT – Catalase

CD – Correntes Diretas

CK – Creatina Kinase

Cu²⁺ - Cobre

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

e⁻ - Elétron

EE – Exercício Excêntrico

ERA – Radiação Efetiva

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

Fe²⁺ - Ferro

GPX – Glutathione Peroxidase

GSH – Glutathione

H⁺ - Hidroxila

HCl – Ácido Clorídrico

HNO₃ – Ácido Nítrico

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

LAFIBE – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício

LASICOM – Laboratório de Síntese e Complexos Multifuncionais

MHz – Megahertz

NADPH - Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

NF-κB – Fator Nuclear Kappa B

NO – Óxido Nítrico

O₂⁻ – Superóxido

OH – Hidróxido

ONOO - Peroxidonitrito
PNM – Neutrófilos Polimorfos
PZT - Piezoelétricos
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RL – Radical Livre
ROOH – Hidroperóxidos Orgânicos
SOD – Superóxido Dismutase
SPSS – Statistical Package for the Social Sciences
TBARS - Ácido Tiobarbitúrico
TNB – Ditionitrobenzóico
TPU - Ultrassom Terapêutico
TV - Televisão
XO – Xantina Oxidase
UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense
UP – Ultrassom
UTP – Ultrassom Terapêutico Pulsado
UST - Ultrassom Terapêutico

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação do projeto pelo CEP – UNESC.....	43
---	-----------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 RADICAIS LIVRES.....	16
1.2 FORMAÇÃO DOS RADICAIS LIVRES DURANTE O METABOLISMO	16
1.3 ROTAS METABÓLICAS NA PRODUÇÃO DAS ERO DURANTE OS EXERCÍCIOS	17
1.4 EXERCÍCIO EXCÊNTRICO	18
1.5 ELETROTERAPIA.....	18
1.6 ULTRA-SOM TERAPÊUTICO.....	19
1.7 DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)	21
1.8 NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	22
2 JUSTIFICATIVA	23
2.1 PROBLEMA	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 ASPECTOS METODOLÓGICOS.....	26
4.1 CARACTERÍSTICAS DA PESQUISA	26
4.2 JUSTIFICATIVA PARA USO DE ANIMAIS	26
4.3 AMOSTRA	26
4.4 PROTOCOLO DE ADAPTAÇÃO AO EXERCÍCIO.....	27
4.5 PROTOCOLO DO EXERCÍCIO EXCÊNTRICO DE LONGA DURAÇÃO.....	27
4.6 PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	27
4.7 PROTOCOLO DE LESÃO MUSCULAR E TRATAMENTO	28
4.8 PROCEDIMENTOS PARA MINIMIZAR, ELIMINAR OU PROTEGER O DESCONFORTO OU RISCO CAUSAL DO ANIMAL.....	29
4.9 CRITÉRIOS DE SUSPENSÃO OU ENCERRAMENTO DA PESQUISA.....	29
4.10 INCLUSÃO E EXCLUSÃO DE ANIMAIS NA PESQUISA	29
4.11 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	29
4.12 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	31
4.13 ANÁLISE DE DADOS	31
5 CRONOGRAMA.....	32

6 ORÇAMENTO.....	<u>33</u>
REFERÊNCIAS.....	<u>34</u>
ANEXOS	<u>39</u>

1 INTRODUÇÃO

1.1 RADICAIS LIVRES

Os radicais livres (RL) são átomos ou moléculas que em virtude de seus elétrons desemparelhados, apresentam uma grande reatividade, que os faz reagir com outras moléculas, a fim de encontrar um estado químico estável. Cada radical livre possui pelo menos um elétron não pareado em seu orbital externo, o qual os torna altamente reativos (POWERS; HOMLEY, 2000).

Por outro lado quando em excesso, podem reduzir os elétrons (oxidar) de compostos como proteínas, lipídeos e DNAs provocando sérios efeitos deletérios ao sistema biológico (HALLIWEL; GUTTERIDE, 1999).

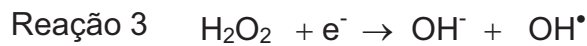
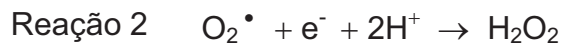
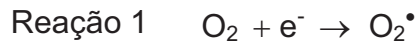
Durante o exercício físico, os (RL) podem contribuir para fadiga muscular, inativação de várias enzimas do ciclo de Krebs, e alteração no equilíbrio da produção de energia na cadeia transportadora de elétrons (POWRES; HOMELY, 2000).

1.2 FORMAÇÃO DOS RADICAIS LIVRES DURANTE O METABOLISMO

Normalmente 2 a 5% do oxigênio utilizado na fosforilação oxidativa (STE) são desviados para a formação de RL. Porém nem todos RL formados nos sistemas biológicos são derivados do oxigênio (MATSUO; KANEKO, 2000).

Na parte final da cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo oxidadase remove um elétron de cada vez das quatro moléculas reduzidas de citocromo c oxidando-as, e adicionando os quatro elétrons O_2 para formar água (em torno dos 95 a 98% dos 85 a 90 citados acima). A existência desta enzima é capaz de neutralizar a tendência monoelétrica do oxigênio, forçando a reação a ocorrer numa única etapa sem a formação de intermediários; os restantes cerca de 2 a 5% são diminuídos univalentemente, em compostos denominados espécies reativas de

oxigênio (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999). Algumas das reações de formação da ERO que dão origem ao anion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila estão ilustradas abaixo.



Fé/Cu



(HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999).

1.3 ROTAS METABÓLICAS NA PRODUÇÃO DAS ERO DURANTE OS EXERCÍCIOS

Dependendo do tipo de exercício e intensidade, têm sido propostos vários mecanismos na geração de ERO. De acordo com (KÖNIG; BERG, 2002) as rotas metabólicas para produção das ERO durante os exercícios podem acontecer das seguintes maneiras:

- 1) Aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ na cadeia respiratória;
- 2) Xantina Oxidase (XO) cataliza a degradação do AMP durante o trabalho muscular isquêmico levando ao aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$;
- 3) Ativação de neutrófilos polimorfos (PNM) após danos musculares induzidos por exercícios;
- 4) Menor homeostase do cálcio em músculos estressados;
- 5) Aumento de citocinas e ativação de NF-kB, auto-oxidação da catecolaminas, etc.;
- 6) Metabolismo das gorduras.

1.4 EXERCÍCIO EXCÊNTRICO

Os exercícios excêntricos são acometidos por ação muscular dupla de alongamento e contração (força) no mesmo instante (APPEL; SOARES; DUARTE, 1992). O custo energético neste tipo de exercício e o número de unidades motoras recrutados durante a fase excêntrica comparando com a fase concêntrica (1/3 a 1/5) são menores (ARMSTRONG; WARREN; WARREN, 1991). Esta menor ativação no número de unidades motoras é responsável por uma maior produção de força por fibra muscular e um alongamento excessivo provocando intensas lesões musculares (FAULKER; BROOKS; OPITECK, 1993).

1.5 ELETROTERRAPIA

A corrente elétrica é usada para fins terapêuticos em geral e especialmente para combater a dor, ela apresenta uma história muito extensa, a qual nos deteremos em algumas delas, já na antiguidade, Egito, 2750 a.C., descargas de peixes elétricos foram utilizadas com finalidade terapêutica (AGNE, 2005).

Segundo Low e Reed (2001), a eletroterapia pode ser definida como o tratamento de pacientes com a utilização de meios elétricos.

Kahn (2001) cita que a eletricidade pode ser denominada como um agente terapêutico. O uso da eletricidade com fins terapêuticos tem aumentado nos últimos anos e agora inclui uma ampla variedade de aparelhos. O espectro eletromagnético, variando desde o rádio e as transmissões de TV até as radiações cósmicas e gama, é a fonte da maioria das modalidades da eletroterapia. Recebendo radiações solares, o corpo humano é capaz de separar seletivamente cada componente de acordo com sua composição anatômica e necessidade, e absorver comprimentos de onda do espectro para efeitos fisiológicos específicos de acordo com o comprimento ou frequência de onda.

Starkey (2001) ainda cita (sobre correntes elétricas) que dependendo do percurso do fluxo são classificadas em correntes diretas (CD) ou correntes alternadas (CA). Uma terceira classificação, corrente em pulso, representa uma corrente que foi modificada a fim de produzir efeitos biofísicos específicos. Os termos “alternados” e “diretos” descrevem o fluxo ininterrupto de elétrons, ao passo que “em pulso” indica que o fluxo de elétrons é periodicamente interrompido. Correntes em pulso podem fluir em uma direção, de forma semelhante à CD, ou podem ter movimento bidirecional, como na CA. Entretanto, as correntes em pulso são caracterizadas por períodos sem fluxo de corrente.

1.6 ULTRASSOM TERAPÊUTICO

O ultrassom é uma modalidade de penetração profunda, capaz de produzir alterações nos tecidos, por mecanismos térmicos e não-térmicos (mecânicos). Os efeitos da aplicação de ultra-som podem incluir o aumento da velocidade de reparo do tecido e da cura de lesões, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da extensibilidade do tecido, dissolução de depósitos de cálcio, redução da dor e de espasmo muscular, por meio da alteração da condução nervosa, e alterações da permeabilidade da membrana celular. A energia ultra-sônica também é utilizada para liberar medicamentos em tecidos subcutâneos e para ajudar a cura de fraturas (STARKEY, 2001).

Indo na mesma direção Kahn (2001) fala que diferente das modalidades elétricas o ultrassom é o único em que a forma de onda longitudinal associada com som não é de natureza eletromagnética. As formas de onda eletromagnéticas podem ser transmitidas no vácuo, tal como no espaço interplanetário, mas as ondas sonoras exigem um meio para sua transmissão. Como uma forma de onda, o som segue as regras da física no que diz respeito à reflexão, absorção, refração e dispersão. Às vezes, essa forma de onda longitudinal se torna transversa e pode apresentar problemas quanto a formação indesejada de calor.

O ultrassom também é utilizado para a dor e outras condições patológicas, pela capacidade das ondas sonoras introduzirem moléculas de substâncias químicas através da pele por um processo chamado *fonoforese*.

A corrente alternada de alta-freqüência de 1MHz é imposta ao cristal PZT do transdutor ou cabeçote, transformando a energia do cristal em uma vibração ou oscilações deformantes da estrutura do cristal na mesma freqüência, 1MHz. O cristal é sustentado por cimento em contato com a placa metálica ou interface plástica do transdutor e conseqüentemente causa vibração na corrente no mesmo 1MHz de freqüência (KAHN, 2001).

As ondas ultra-sônicas penetram de 4 a 6 cm nos tecidos. Entretanto, os fatores de absorção, refração, reflexão e dispersão devem ser sempre considerados o tempo todo, na propagação das ondas longitudinais ou transversais. Tecidos com alto teor de fluidos tais como o sangue e os músculos, irão absorver ondas sonoras melhor do que os tecidos menos hidratados (KAHN, 2001).

O ultrassom também tende a aumentar as reações e os processos químicos locais, e assegura a circulação dos elementos e radicais necessários por recombinação (KAHN, 2001).

Starkey (2001) cita que o ultrassom é produzido por uma corrente alternada que flui através de um cristal piezoelétrico, como um quartzo, titanato de bário, zirconato de chumbo ou titanato, alojado em um transdutor. Os cristais sintéticos substituíram os naturais, produzindo um campo de energia melhor e mais consistente. Os cristais piezoelétricos produzem cargas elétricas positivas e negativas quando se contraem ou se expandem. Ocorre um efeito piezoelétrico inverso quando uma corrente alternada passa através do cristal piezoelétrico, resultando na contração e expansão dos cristais. O ultrassom é produzido por meio do efeito piezoelétrico inverso. A vibração dos cristais causa a produção mecânica de ondas sonoras de alta freqüência.

As vibrações acústicas pelo UST induzem mudanças celulares alterando o gradiente de concentração das moléculas e íons cálcio e potássio, o que estimula a atividade celular. Esse fenômeno pode resultar em diversas alterações, como aumento da síntese protéica e secreção de mastócitos, modificações na mobilidade dos fibroblastos, dentre outras. Embora esses mecanismos não sejam ainda perfeitamente conhecidos, outros trabalhos demonstram a influência do UST na

reparação tecidual pelas alterações provocadas na permeabilidade da membrana das células. Alguns autores sugerem que estes efeitos ocorram devido à cavitação, outros afirmam que o ultrassom produz modificações hemodinâmicas microvasculares, aumentando a perfusão, o tecido de granulação, a reparação tecidual, a proliferação fibroblástica e o aumento de células precursoras. (TER HAAR, 1998 apud MATHEUS et al, 2008).

1.7 DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

Devido a essas características da TPU, sua utilização pode ser associada com fármacos antioxidantes e antiinflamatórios (Fonoforese), com o objetivo de potencializar os efeitos cicatrizantes dessas duas terapias (HILL; FENWICK; MATTHEWS, 2005).

Dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente dipolar amplamente usado para solubilizar pequenas moléculas orgânicas (CAMICI; STEFFEL; AKHMEDOV, 2006). Atualmente, DMSO é comumente usado em estudos no músculo esquelético como um seletivo antioxidante ou como solvente para numerosas drogas (VELASCO; TRUJILLO; VASQUEZ, 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 (MOHANRAJ; MEROLA; WRIGHT, 1998).

Meis (1998) e Velasco; Trujillo; Vasquez (2003) postulam 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.

Considerando que o estresse oxidativo está envolvido no processo de cicatrização muscular, o uso da UTP em conjunto com DMSO e nanopartículas de ouro podem agir de forma muito efetiva nesse processo devido a essas terapias agirem em vias importantes na produção de ERO.

1.8 NANOPARTÍCULAS DE OURO

Nos últimos anos surgiram novas idéias em relação à ciência e tecnologia, a mais nova e estudada se chama nanotecnologia, que já mostrou ser eficaz na geração e elaboração de novas matérias. (KATZ; WILLNER, 2004).

Atualmente, nanomateriais cujas dimensões estão compreendidas de 1 a 100nm, tem sido usado para criar dispositivos únicos numa escala nanométrica. Além de ser importante na criação de novos tipos de ferramentas analíticas para biotecnologia e ciências da (COLVIN, 2003; OBERDÖRSTER, 2004).

Nos últimos anos, nanopartículas inorgânicas cujas estruturas exibem funcionalidade e propriedades biológicas devido ao seu tamanho, tem despertado muito interesse e curiosidade de diferentes grupos e áreas de pesquisa (BHATTACHARYA; MUKHERJEE, 2008).

Estas descobertas vêm acontecendo na ciência e tecnologia desde o entendimento que os materiais em escala nanométrica podem apresentar novos comportamentos e/ou propriedades diferentes daquelas que geralmente apresentam em escala macroscópica. A nanotecnologia é claramente uma área de pesquisa e desenvolvimento muito ampla e interdisciplinar, uma vez que se baseia nos mais diversificados tipos de materiais (polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos e biomateriais), estruturados em escala nanométrica – nanoestruturados de modo a formar blocos de construção (*building blocks*) como *clusters*, nanopartículas, nanotubos e nanofibrilas, que por sua vez são formados a partir de átomos ou moléculas (DURAN, 2006).

No momento as nanopartículas de ouro, que recebem atenção especial devido às propriedades ópticas, eletrônicas, redox e catalíticas (DANIEL; ASTRUC, 2004).

Os compostos de ouro são muito indicados para o tratamento de doença reumáticas (SHAW, 1999). A sua atuação antitumoral da cisplatina, descoberta em 1969 incitou a investigação desta atividade em outros metais, inclusive o ouro. Estimulando à blindagem de muitas fosfinas que contém drogas a base de ouro, particularmente o complexo bis(diphos)Au(I). Este complexo mostrou propriedades

antitumorais promissoras, porém exibiu toxicidade cardiovascular, o que impediu seu uso clínico (BERNERS-PRICE; SADLER, 1987).

Devido às propriedades anti-angiogênicas das nanopartículas de ouro e também pela ausência de achados sobre seus efeitos na cadeia respiratória mitocondrial e estresse oxidativo sua aplicação na lesão muscular em conjunto com ultra-som pulsado podem ter efeitos positivos na cicatrização.

2 JUSTIFICATIVA

Na tentativa de reduzir os efeitos deletérios induzidos pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pelo exercício excêntrico (EE), poucos estudos têm utilizado o ultrassom como forma de tratamento. Contudo, acredita-se que a terapia com ultrassom possa acelerar o processo de recuperação muscular após a lesão induzida por EE em animais. Da mesma forma, o DMSO e a nanopartículas de ouro ainda tem muito o que ser desvendada, mais já consegue mostrar a sua grande importância para alguns fins como para a tecnologia e para fins terapêuticos.

Por isso, neste estudo, temos como principal objetivo mostrar a importância do uso do ultrassom, DMSO e a nanopartículas de ouro na reversão de lesão muscular de ratos.

2.1 PROBLEMA

A associação entre exercício físico e marcadores de estresse oxidativo tem sido alvo de muitos estudos (SENTURK et al, 2001; MASTALLOUDIS et al, 2004; WILBER et al, 2004). Os exercícios físicos de intensidade elevada causam estresse oxidativo resultando em lipoperoxidação (ALESSIO et al, 2000) dano em DNA (HARTMANN; NIESS, 2000) e oxidação de proteínas (ALESSIO et al, 2000;

TIROSH; REZNICK, 2000), diminuição da *performance* (LEE et al, 2002), fadiga e *overtraining* (CARMELI; LAVIAM; REZNICK, 2000).

Em função da elevada taxa metabólica oxidativa durante e após os exercícios extenuantes, verifica-se um aumento expressivo na utilização de oxigênio, em relação aos níveis de repouso, resultando substancialmente no aumento do fluxo de elétrons mitocondrial, e um concomitante aumento na geração das espécies reativas de oxigênio (CARMELI; LAVIAM; REZNICK, 2000).

O estresse oxidativo produzido durante os exercícios físicos depende do tipo, intensidade e duração (MASTALLOUDIS et al, 2004). Durante a realização do exercício excêntrico, por exemplo, a geração de EROs tem sido atribuído a ativação da Xantina Oxidase, a produção de NADPH oxidase, perfusão por isquemia, surto oxidativo dos fagócitos, rompimento nas proteínas que contém ferro, excesso de Ca^{++} acumulado, geralmente resultado da alta intensidade dos exercícios (MCHUGH et al, 1999; CHILDS et al, 2001; GOLDFARB; BLOOMER; MCKENZIE, 2005).

Dados da literatura mostram que os danos oxidativos estão diretamente relacionados com o exercício realizado. Esses danos liberam espécies reativas de oxigênio (ERO) ou radicais livres como ânion superóxido. Para o tratamento desses danos muitas vezes são utilizados alguns recursos eletroterapêuticos, como o ultrassom. Há evidências que a nanopartícula de Ouro e o DMSO podem potencializar a recuperação da lesão. Partindo desses princípios vale questionar: **A junção desses três mecanismos de reversão pode ser mais eficaz do que o tratamento para lesão muscular de forma isolada?**

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETVO GERAL

Avaliar os efeitos de nanopartículas de ouro em conjunto com ultrassom pulsado e DMSO em parâmetros de estresse oxidativo e inflamação em um modelo animal de lesão de quadríceps causada por exercício excêntrico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito do UTP sobre os parâmetros de ERO na lesão muscular, induzida por exercício excêntrico;
- Analisar o efeito do gel DMSO sobre os parâmetros de ERO utilizado no tratamento de lesão muscular, induzida por exercício excêntrico;
- Investigar os efeitos das nanopartículas de ouro sobre os parâmetros de ERO após induzir lesão muscular por exercício excêntrico;
- Analisar o efeito das três terapêuticas em conjunto sobre os parâmetros de ERO após induzir lesão muscular por exercício excêntrico;
- Analisar os danos oxidativos.

4 ASPECTOS METODOLÓGICOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA PESQUISA

Pesquisa experimental com animais; Local: Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC; Laboratório de fisiologia e bioquímica do exercício LAFIBE; Período: de janeiro de 2011 a julho de 2011.

4.2 JUSTIFICATIVA PARA USO DE ANIMAIS

Justifica-se o uso de animais a partir da necessidade de investigar parâmetros moleculares e bioquímicos diretamente no tecido muscular, o que em seres humanos, torna-se invasivo.

4.3 AMOSTRA

Serão utilizados 42 ratos wister machos (200–250g) do biotério da Universidade. Os animais serão agrupados em gaiolas e divididos em 7 grupos, a saber:

Grupo 1 - Controle

Grupo 2 - Lesão sem tratamento

Grupo 3 - Lesão/tratamento/UTP+DMSO

Grupo 4 - Lesão/tratamento/UTP+nanopartículas de ouro

Grupo 5 - Lesão/tratamento/UTP+nanopartículas de ouro+DMSO

Grupo 6 – Lesão/Tratamento/Nanopartículas de ouro

Grupo 7- Nanopartículas de ouro + DMSO

Os animais terão acesso livre a água e comida com temperatura ambiente de 23°C controlado com termostato e ciclo de claro e escuro de 12h. Em todos os experimentos o espaço amostral será seis animais por grupo.

4.4 PROTOCOLO DE ADAPTAÇÃO AO EXERCÍCIO

Os animais serão adaptados em esteira ergométrica durante seis dias consecutivos, uma vez ao dia (45 min de corrida), com velocidade constante ($1.0\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$) e sem inclinação. Será feita a randomização dos animais (dos 42 ratos que correrem melhor, nesta semana, serão selecionados 36 animais para os grupos com exercício). Lactato sanguíneo: Os níveis de lactato serão determinados imediatamente após a primeira e a última seção de exercício na semana de adaptação, antes e após o protocolo de exercício excêntrico de longa duração em todos os animais (FAVIER et al, 1986) utilizando o lactímetro.

4.5 PROTOCOLO DO EXERCÍCIO EXCÊNTRICO DE LONGA DURAÇÃO

Quarenta e oito horas após a última sessão de exercício os animais serão submetidos ao exercício excêntrico de longa duração. O modelo de exercício excêntrico utilizado será a corrida em declive (declive “-16° graus”) (ARMSTRONG; WARREN; WARREN, 1991). Os animais serão submetidos a corrida em declive com duração de 2:08 horas (tempo médio de maratonista) com uma velocidade constante de $1\text{m}/\text{min}^{-1}$.

4.6 PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de ouro serão obtidas por meio de redução química, segundo apresentado por Storhoff (1998). As vidrarias serão lavadas com água

régia (3/1 HCl/ HNO₃) e água ultra pura para remoção de água régia residual. As nanopartículas de ouro serão preparadas pela redução do ácido auroclorídrico (HAuCl₄) por citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇). Uma solução aquosa de HAuCl₄ (1mM) foi colocada em refluxo e adicionado 5 ml da solução de citrato de sódio a 38.8mM, o somado resultou em uma mudança em cor de amarelo claro para vermelho. Após a mudança de cor manteve-se o refluxo por mais 15 minutos, permitindo o resfriamento da temperatura. As nanopartículas serão preparadas no laboratório de síntese e complexo multifuncionais - LASICOM.

4.7 PROTOCOLO DE LESÃO MUSCULAR E TRATAMENTO

O modelo de lesão muscular será desenvolvido de acordo com Armstrong et al. (1991). O tratamento com ultrassom pulsado (Imbramed, Brazil (6 min de duração, frequência de 1.0 MHz, intensidade de 0.8 W/cm², área de radiação efetiva [ERA] 1 cm²) e com a nanopartículas de ouro será aplicado em 2, 6, 12, 24, e 36 horas após a lesão. A área tratada com USP, gel nanopartículas de ouro (AuN) e USP+ gel AuN será de aproximadamente 2 cm de acordo com Rizzi (2006). O movimento do cabeçote será circular de acordo com Saliba et al. (2007), será realizado da forma pulsada por causa da localização do quadríceps que é mais superficial e a forma pulsada do ultra-som atinge estruturas mais superficiais. Todo o tratamento será aplicado no quadríceps, após 2 horas da última aplicação os animais serão anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (20mg/kg) posteriormente eutanasiados por decapitação e o tecido do quadríceps será removido cirurgicamente (FREITAS; FREITAS; SILVEIRA, 2007). Uma parte será utilizada para estudo da função mitocondrial e outra será imediatamente congelada a -80° C para posteriores análises bioquímicas que serão realizadas no laboratório de fisiologia e bioquímica do exercício - LAFIBE. O descarte dos animais será feito do acondicionamento em saco branco leitoso e armazenados em freezer -40 para posterior tratamento e deposição final em aterro sanitário, conforme procedimentos estabelecidos pela Vigilância Sanitária (RDC 306/2004).

4.8 PROCEDIMENTOS PARA MINIMIZAR, ELIMINAR OU PROTEGER O DESCONFORTO OU RISCO CAUSAL DO ANIMAL

Os ratos serão anestesiados para a realização dos procedimentos cirúrgicos através da administração intraperitoneal de xilasina e cetamina e a perda dos reflexos pedal e caudal serão usados como controle da anestesia. Após o procedimento cirúrgico todos os animais receberão analgésicos (dipirona sódica 30 mg/Kg, i.p.).

4.9 CRITÉRIOS DE SUSPENSÃO OU ENCERRAMENTO DA PESQUISA

A pesquisa poderá ser encerrada por motivos eventuais que comprometam os objetivos previstos nesse estudo, como por exemplo, surgir alguma doença que afete o estado de saúde dos animais ou ainda se os animais não conseguirem realizar as seções de exercício na esteira, como previsto neste projeto.

4.10 INCLUSÃO E EXCLUSÃO DE ANIMAIS NA PESQUISA

Será utilizado como critério de inclusão ser Ratos Wistar macho, com 8 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UNESC. Como critério de exclusão o não preenchimento dos requisitos citados e que não responderem adequadamente ao exercício na esteira.

4.11 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

a) Marcadores de dano celular

Creatina Kinase: será determinada com auxílio de kits específicos fornecido pela Labtest Diagnóstica SA. A dosagem será feita a partir de sistema enzimático com reação de ponto final em amostras plasmáticas sanguíneas, segundo as orientações técnicas observada na bula dos referidos kits.

b) Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

Ânion Superóxido: determinada pela taxa de oxidação da adrenalina lido em espectrofotômetro a 480nm (MCCORD; FRIDOVICH,1969).

c) Atividade de enzimas antioxidantes

Superóxido dismutase (SOD): a atividade enzimática da SOD será determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480nm) (BANNISTER; CALABRESE,1987).

Catalase (CAT): A atividade da CAT será determinada pela queda na absorbância (240nm) correspondente ao consumo de peróxido de hidrogênio (AEBI, 1984).

Glutationa Peroxidase (GPX): A GPX é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H_2O e álcool, usando a glutathione (GSH) como doador de elétrons. Está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A determinação da atividade da glutathione peroxidase (GPX) é feita a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotômetro (340nm) (FLOHÉ; GUNZLER, 1984).

d) Marcadores de Danos Oxidativos

Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS): Como índice de peroxidação de lipídeos será verificado a formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico medido espectrofotometricamente (532nm) (DRAPER; HADLEY,1990).

Carbonilação de Proteínas: Os danos oxidativos em proteínas serão mensurados pela determinação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilhidrazina como previamente descrito por Levine et al. (1990). O conteúdo de carbonil será determinado espectrofotometricamente em 370nm usando um coeficiente 22.0000 Molar.

Sulfidrilas: O ácido ditionitrobenzóico é reduzido por tióis gerando um derivado amarelo (TNB) lido espectrofotometricamente a 412 nm. Este método determina os tióis totais da amostra, sendo um parâmetro de medida de dano oxidativo às proteínas da mesma (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

4.12 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Estimando-se uma relação média (\pm DP) da superóxido dismutase de $4,6 \pm 2,5\%$ no dia "0" dos diferentes modelos de treinamento físico é de $9,3 \pm 4,8\%$ após os programas de treinamento o tamanho amostral necessário para detectar uma diferença significativa, considerando um nível de significância de 5% e poder de 80%, é de 30 camundongos divididos em ($n=6$) sete grupos.

4.13 ANÁLISE DE DADOS

Os dados serão expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido pelo teste *post hoc Tukey*. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $p<0,05$. Será utilizado o SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 16.0 como pacote estatístico.

5 CRONOGRAMA

O estudo foi desenvolvido conforme o cronograma a seguir:

ATIVIDADES	CALENDÁRIO 2010				CALENDÁRIO 2011										
	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov
Elaboração do Projeto	X	X													
Submissão do Projeto ao Comitê de Ética			X	X	X	X	X	X							
Aquisição de Animais								X							
Treinamento										X	X				
Eutanásia											X				
Ensaio Bioquímicos												X			
Análise Estatística												X			
Discussão													X		
Produção de Artigo													X		
Defesa															X
Submissão de Artigos															X

6 ORÇAMENTO

Discriminação	Quantidade	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Animais	36U	15,00	450,00
Material de Expediente			200,00
Fitas de Lactato	2cx	350,00	300,00
Reagentes			2.000,00
Outros			1.000,00
Total			R\$ 3.950,00

Os custos serão financiados pelo Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício - LAFIBE.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Meth Enzymol** 1984, 105:121-126.

AGNE; J.E. **Eletrotermoterapia: teoria e prática**. Ed. Orium, Rio Grande do Sul, 2005.

AKSENOV, M.Y; MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**. 2001, 20:141-5.

ALESSIO, H.M; et al. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Med Sci Sports Exerc**. 2000, 32:1576-1581.

APPEL, H.J; SOARES, J.M.C; DUARTE, J.A.R. Exercise muscle damage and fatigue. **Sports Med**. 1992, 13:108-115.

ARMSTRONG, R.B; WARREN, G.L; WARREN AND J.A. Mechanisms of exercise-induced muscle fiber injury. **Sports Med**. 1991, 12:184-207.

BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L. Assays for SOD. **Meth. Biochem. Anal** 1987, 32:279-312.

BHATTACHARYA R; MUKHERJEE P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews** 60: 1289–1306. 2008.

BERNERS-PRICE S.J; SADLER P.J. Interaction of the antitumor Au(I) complex [Au(Ph₂P (CH₂)₂PPh₂)₂]Cl with human blood plasma, red cells, and lipoproteins: ³¹P and ¹H NMR studies. **Journal of inorganic biochemistry**. 31: 267–281.1987.

CAMICI, G.G; STEFFEL, J; AKHMEDOV, A. Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation. **Circulation** 114:1512-1521. 2006.

CARMELI, E; LAVIAM, G; REZNICK, A.Z. The role of antioxidant nutrition in exercise and aging. In: Radák Z (ed). Free Radicals in Exercise and Aging. **Human Kinetics, Champaign** 2000, 73-115.

CHILDS, A; et al. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. **Free Radic Biol Med.** 2001, 31:745-753.

COLVIN, V. The potential environmental impacts of engineered nanomaterials. **Nature Biotechnology** 21: 1166-1170. 2003.

DANIEL, M.C; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical reviews.** 104: 293–346. 2004.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Meth. Enzymol** 1990, 186:421-431.

DURAN, N; et al. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.** 1ª ed. São Paulo. Artliber. 2006.

FAULKNER, J.A; BROOKS, S.V; OPITECK, J.A. Injury to skeletal muscle fibers during contractions: conditions of occurrence and prevention. **Physical Therapy** 1993, 73:911-921.

FAVIER, R.J; et al. Endurance exercise training reduces lactate production. **J Appl Physiol** 1986, 61:885-889.

FLOHÉ, I.; GUNZLER, W. Assays of glutathione peroxidase. *Methods enzymol.* V. 105, p. 114-21, 1984.

FREITAS, L.S; FREITAS, T.P; SILVEIRA, P.C. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. **Cell Biology International** 31: 482 – 488. 2007.

GOLDFARB, A.H; BLOOMER, R.J; MCKENZIE, M.J. Combined Antioxidant Treatment Effects on Blood Oxidative Stress after Eccentric. **Med Sci Sports Exerc.** 2005, 37:234-239.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radical in Biology Medicine University Press. **Oxford, NY.** 1999.

HARTMAN, A; NIESS, A. Oxidative DNA damage in exercise. In: Sen C; Packer I; Hanminen O., eds. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise.* Amesterdan: Elsevier 2000, 195-217.

HILL G.E; FENWICK S; MATTHEWS B.J. **Ultrasound in medicine & biology** 31: 1701–1706. 2005.

KAHN, J. **Princípios e práticas de eletroterapia.** 4 ed. São Paulo: Santos, 2001

KATZ, E; WILLNER, I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. **Angewandte Chemie (International ed. in English)** 43 (45): 6042-108. 2004.

KÖNIG, D.; BERG, A. Exercise and oxidative stress: is there a need for additional antioxidants. **Österreichisches J. Für Sportmedizin** 2002.

LEE, J; et al. Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. **Med Sci Sports Exerc.** 2002, 34:443-448.

LEVINE, R.L; et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Meth Enzymol** 1990, 186:464-478.

LOW, J; REED, A. **Eletroterapia explicada: Princípios e pratica.** Ed. Manole, São Paulo, 3° edição, 2001

MASTALOUDIS, A; et al. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. **Free Radic Biol Med.** 2004, 36:1329-41.

MATHEUS, J.P.C; et al. Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. **Revista brasileira de fisioterapia**, São Carlos- SP, maio/junho. 2008, seção:12.

MATSUO, M.; KANEKO, T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radák Z, editor. **Free radicals in exercise and aging.** Champaign: Human Kinetics 2000, 73-115.

MCHUGH, M.P; et al. Exercise induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect. **Sports Med.** 1999, 27:157-170.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). **J. Biol. Chem.** 1969, 244:6049–6055.

MEIS L. Control of heat production by the Ca²⁺ - ATPase of rabbit and trout sarcoplasmic reticulum. *American journal of physiology. Cell physiology* 274:1738-1744. 1998.

MOHANRAJ P; MEROLA J; WRIGHT V.P. Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions. **Journal of applied physiology** 84: 1960-1966. 1998.

OBBERDÖRSTER, E. Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. **Environmental Health Perspectives** 112:1058-1062. 2004.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho. 3. ed. São Paulo: Manole, 2000. 527 p. ISBN 8520410464

RIZZI, C.F. Effects of Low-Level Therapy (LLLT) on the Nuclear Factor (NF)-kB Signaling Pathway in Traumatized Muscle. **Lasers in Surgery and Medicine** 2006, 38:704-713.

SALIBA, S; et al. Phonophoresis and the absorption of dexamethasone in the presence of an occlusive dressing. **Journal of athletic training** 42(3): 349-54. 2007.

SENTÜRK, U.K; et al. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. **J Appl Physiol** Nov 2001; 91(5):1999-2004.

SHAW I.C. Gold-based therapeutic agents. **Chemical reviews**. 99: 2589–2600. 1999.

STARKEY, C. **Recursos terapêuticos em fisioterapia**. São Paulo: Manole, 2001.

STORHOFF. **One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes**. Publication Date (Web): February 20, 1998. Disponível em: <www.pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja972332i> . Acesso em: 27/11/2009.

TIROSH, O; REZNICK, O. Chemical bases and biological relevance of protein oxidation. In : Sen CK; Packer I; Hanminen O., eds. **Handbook of oxidants and antioxidants in exercise**. New York: Elsevier, 2000, 89-114.

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.

WILBER, R.L; et al. Effect of FIO₂ on oxidative stress during interval training at moderate altitude. **Med Sci Sports Exerc**. 2004, 36:1888-94.

ANEXOS

ANEXO 1



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou as aulas práticas abaixo.

Protocolo: 07/2011

Professor:

Ricardo Aurino de Pinho

Título: Resposta do ultra-som terapêutico na forma pulsada e de nano partículas de ouro e dmsol na reversão dos danos oxidativos em quadrípedes de ratos induzidos a lesão por exercícios excêntricos.

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar a CEUA. www.unesc.net/propex/ceua.

Criciúma, 23 de maio de 2011.

Patricia Fernanda Schuck
Patricia Fernanda Schuck

Coordenadora do CEUA

CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

Resposta do Ultrassom Terapêutico Pulsado (UTP), Dimetilsulfóxido (DMSO), nanopartículas de ouro (fonoforese) sobre o Estresse Oxidativo em quadríceps de ratos induzidos a lesão muscular por exercício excêntrico.

Pulsed Ultrasound Therapy Response (UTP), dimethyl sulfoxide (DMSO), gold nanoparticles (phonophoresis) on oxidative stress in rat quadriceps muscle injury induced by eccentric exercise.

Guilherme L. da Rosa

Bruna G. Pozzi

Talita Tuon

Luciano A. Silva

Ricardo A. Pinho

Curso de Fisioterapia, UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil.

Endereço para correspondência:

Guilherme L. da Rosa

Rua Abílio Paulo, nº 115 Apartamento 301

CEP: 88820-010 – Criciúma, SC, Brasil

Contato: 55(48)99883427

E-mail: Guibaratta@hotmail.com

RESUMO

Introdução: As lesões musculares causadas por exercício excêntrico afetam diversas pessoas praticantes de atividade física. O UTP, dimetilsulfóxido (DMSO) e as nanopartículas de ouro surgem como alternativa no tratamento destas lesões musculares. **Objetivo:** Analisar o efeito bioquímico mediante a aplicação do UTP, DMSO (fonoforese) e da nanopartículas de ouro (fonoforese) em quadríceps de ratos induzidos a lesão muscular por exercício excêntrico. **Métodos:** Foram utilizados 42 ratos wistar, machos (200-250g), com 8 semanas de idade. Os animais foram agrupados em gaiolas (n=6) e divididos em 7 grupos, Grupo 1: controle / Grupo 2: lesão sem tratamento / Grupo 3: lesão / tratamento / UTP + DMSO / grupo 4: lesão / tratamento /UTP + nanopartículas de ouro / Grupo 5: lesão / tratamento / UTP + nanopartículas de ouro + DMSO / Grupo 6: Lesão/ tratamento Nanopartículas de ouro / Grupo 7:Lesão / tratamento Nanopartículas de ouro + DMSO e randomizados. Os animais foram induzidos a lesão muscular através do exercício excêntrico (declive “-16° graus”). O tratamento com ultra-som pulsado associado ao DMSO e com a nanopartículas de ouro foi aplicado em 2, 6, 12, 24, e 36hs após a lesão. Após 2 horas da última aplicação os animais foram anestesiados e posteriormente eutanasiados por decapitação e o tecido do quadríceps foi removido cirurgicamente. Foi analisada a produção de ERO, atividade da creatina quinase, marcadores de danos oxidativos e atividade das enzimas antioxidantes. **Resultados:** Os resultados mostram que o UTP+DMSO+nanopartículas de ouro ajudaram na redução da lesão muscular. CK, anion, níveis de Tbars e carbonilação de proteínas, SOD e GPX diminuíram no grupo tratado com ultrassom+DMSO+nanopartículas em relação ao grupo lesão sem tratamento. **Conclusão:** Nossos achados demonstram que o ultrassom, DMSO e a nanopartículas de ouro são eficazes na redução da lesão muscular e do estresse oxidativo acelerando o processo de recuperação muscular e reduzindo o estresse oxidativo.

Palavras Chave: Exercício excêntrico, Lesão muscular, Ultrassom, Dimetilsulfóxido, Nanopartículas de ouro.

ABSTRACT

Introduction: The muscle damage caused by eccentric exercise affect most people who exercise. Ultrasound, dimethylsulfoxide (DMSO) and gold nanoparticles appear as an alternative in the treatment of muscle injuries. **Objective:** To analyze the biochemical effect through the application of pulsed ultrasound, DMSO and gold nanoparticles (phonophoresis) in rat quadriceps muscle injury induced by eccentric exercise. **Methods:** 42 male Wistar rats (200-250g), with 8 weeks of age. The animals were group in cages (n = 7) and divided into seven groups: Group 1: control / Group 2: untreat lesions / Group 3: injury / treatment / DMSO + UP / Group 4: injury / treatment / gold nanoparticles + DMSO / Group 5: injury / treatment / gold nanoparticles + UP + DMSO / Group 6: Gold nanoparticles / Group 7: Nanoparticles of gold + DMSO and randomized. Animals were induced muscle injury by eccentric exercise (slope "° -16 degrees"). Treatment with pulsed ultrasound associated with DMSO and the gold nanoparticles was applied at 2, 6, 12, 24, and 36 hours after injury. After two hours of the last application the animals were anesthetized and then euthanized by decapitation and the tissue of the quadriceps muscle was surgically removed. We analyzed the production of ROS, creatine kinase activity, markers of oxidative damage and antioxidant enzyme activities. **Results:** The results show that ultrasound + DMSO + gold nanoparticles help in reducing muscle damage. CK, anion, levels of TBARS and protein carbonylation, SOD and GPX decreased in the group treated with ultrasound + DMSO + nanoparticles compared to the untreated injury group. **Conclusion:** Our findings demonstrate that ultrasound, DMSO and gold nanoparticles are effective in reducing muscle damage and oxidative stress accelerating the process of muscle recovery and reducing oxidative stress.

Keywords: Eccentric exercise, Muscle injury, Ultrasound, dimethylsulfoxide, gold nanoparticles

INTRODUÇÃO

Lesões musculares esqueléticas podem ocorrer em profissionais ou esportistas recreativos. Essas lesões ocorrem através de uma variedade de mecanismos, tais como (laceração e contusões), direta ou indireta (isquemia ou tensão), mas o processo geral de reparação muscular é semelhante na maioria dos casos ⁽¹⁾.

Durante o exercício físico, os radicais livres (RL) podem contribuir para fadiga muscular, inativação de várias enzimas do ciclo de Krebs, e alteração no equilíbrio da produção de energia na cadeia transportadora de elétrons causando a lesão muscular ⁽²⁾.

Muitos estudos têm demonstrado um aumento nas espécies reativas de oxigênio (ERO) e marcadores de dano oxidativo no sangue e nos tecidos de seres humanos e animais durante e após a lesão muscular ⁽¹⁾.

Os exercícios excêntricos são acometidos por ação muscular dupla de alongamento e contração (força) no mesmo instante. O custo energético neste tipo de exercício e o número de unidades motoras recrutados durante a fase excêntrica comparando com a fase concêntrica (1/3 a 1/5) são menores ⁽³⁾.

A eletroterapia pode ser definida como o tratamento de pacientes com a utilização de meios elétricos. O uso da eletricidade com fins terapêuticos tem aumentado nos últimos anos e atualmente inclui uma ampla variedade de aparelhos. Os efeitos da aplicação de ultrassom podem incluir o aumento da velocidade de reparo do tecido e da cura de lesões, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da extensibilidade do tecido, dissolução de depósitos de cálcio, redução da dor e de espasmo muscular, por meio da alteração da condução nervosa, e alterações da permeabilidade da membrana celular ⁽⁴⁾.

O ultrassom é utilizado para a dor e outras condições patológicas, pela capacidade das ondas sonoras introduzirem moléculas de substâncias químicas através da pele por um processo chamado *fonoforese* ⁽⁴⁾.

Dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente dipolar amplamente utilizado para solubilizar pequenas moléculas orgânicas. Atualmente o DMSO é comumente usado em estudos de músculos esqueléticos como um antioxidante seletivo ou como um solvente em numerosas drogas ⁽⁵⁾.

Atualmente, nanomateriais cujas dimensões estão compreendidas de 1 a 100nm, tem sido usado para criar dispositivos únicos numa escala nanométrica. Além de ser importante na criação de novos tipos de ferramentas analíticas para biotecnologia e ciências da saúde ⁽¹⁾.

Considerando que o estresse oxidativo acontece no processo de cicatrização após a lesão muscular, o objetivo do estudo foi avaliar a eficácia UTP, dimetilsulfóxido (DMSO) e da nanopartículas de Ouro no tratamento da lesão muscular *em ratos* induzido por exercício excêntrico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 42 ratos wistar machos (200–250g) provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Brasil. Os animais foram agrupados em gaiolas e divididos em 7 grupos, a saber: Grupo 1: controle / Grupo 2: lesão sem tratamento / Grupo 3: lesão / tratamento / UTP + DMSO / grupo 4: lesão / tratamento /UTP + nanopartículas de ouro / Grupo 5: lesão / tratamento / UTP + nanopartículas de ouro + DMSO / Grupo 6: Lesão/ tratamento Nanopartículas de ouro / Grupo 7: Lesão / tratamento Nanopartículas de ouro + DMSO. Os animais tiveram acesso livre a água e comida com temperatura ambiente de 23°C controlado com termostato e ciclo de claro e escuro de 12h. Em todo o experimento o espaço amostral foi composto por seis animais por grupo.

Modelo de lesão muscular

Os animais foram adaptados em esteira ergométrica durante seis dias consecutivos, uma vez ao dia (45 min de corrida), com velocidade constante ($1.0\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$) e sem inclinação, quarenta e oito horas após a última sessão de exercício os animais foram submetidos ao exercício excêntrico de longa duração. O modelo de exercício excêntrico utilizado foi a corrida em declive (declive “-16°

graus”) ⁽³⁾. Os animais foram submetidos à corrida em declive com duração de 2:08 horas (tempo médio de maratonista) com uma velocidade constante de $1\text{m}/\text{min}^{-1}$.

Tratamento

O tratamento com ultrassom pulsado (Imbramed, Brazil (6 min de duração, frequência de 1.0 MHz, intensidade de $0.8\text{ W}/\text{cm}^2$, área de radiação efetiva [ERA] 1 cm^2)) e com a nanopartículas de ouro foi aplicado em 2, 6, 12, 24, e 36 hs após a lesão. A área tratada com UTP, gel nanopartículas de ouro (AuN) e gel DMSO foi de aproximadamente 2 cm^2 ⁽⁴⁾. O movimento do cabeçote foi circular, realizado da forma pulsada devido a localização do quadríceps que é mais superficial. Todo o tratamento foi aplicado no quadríceps, após 2 horas da última aplicação os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina ($80\text{ mg}/\text{kg}$) e xilazina ($20\text{mg}/\text{kg}$) posteriormente eutanasiados por decapitação e o tecido do quadríceps foi removido cirurgicamente ⁽⁶⁾. Uma parte foi utilizada para o presente estudo e outra foi imediatamente congelada a -80° C para posteriores análises bioquímicas.

Protocolo de Eutanásia

Duas horas após à ultima aplicação, os animais foram mortos por decapitação, a região lesionada do músculo quadríceps foi removida e imediatamente congelada no freezer -80 para posteriores análises.

Ensaio Bioquímicos

Creatina Kinase (CK): foi determinada com auxílio de kits específicos fornecido pela Labtest Diagnóstica SA. A dosagem foi feita a partir de sistema enzimático com reação de ponto final em amostras plasmáticas sanguíneas, segundo as orientações técnicas observada na bula dos referidos kits.

Ânion Superóxido: Foi determinado pela taxa de oxidação da adrenalina lido em espectrofotômetro a 480nm ⁽⁷⁾.

Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Como índice de peroxidação de lipídeos foi verificado a formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico medido espectrofotometricamente (532nm) ⁽⁸⁾.

Carbonilação de Proteínas: Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilhidrazina. ⁽⁹⁾ O conteúdo de carbonil foi determinado espectrofotometricamente em 370nm usando um coeficiente 22.0000 Molar.

Superóxido dismutase (SOD): A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livres, catalisando a dismutação do radical anion superóxido, a atividade enzimática da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480nm) ⁽¹⁰⁾.

Catalase (CAT): A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do H₂O₂, a atividade da CAT foi determinada pela queda na absorvância (240nm) correspondente ao consumo de peróxido de hidrogênio ⁽¹¹⁾.

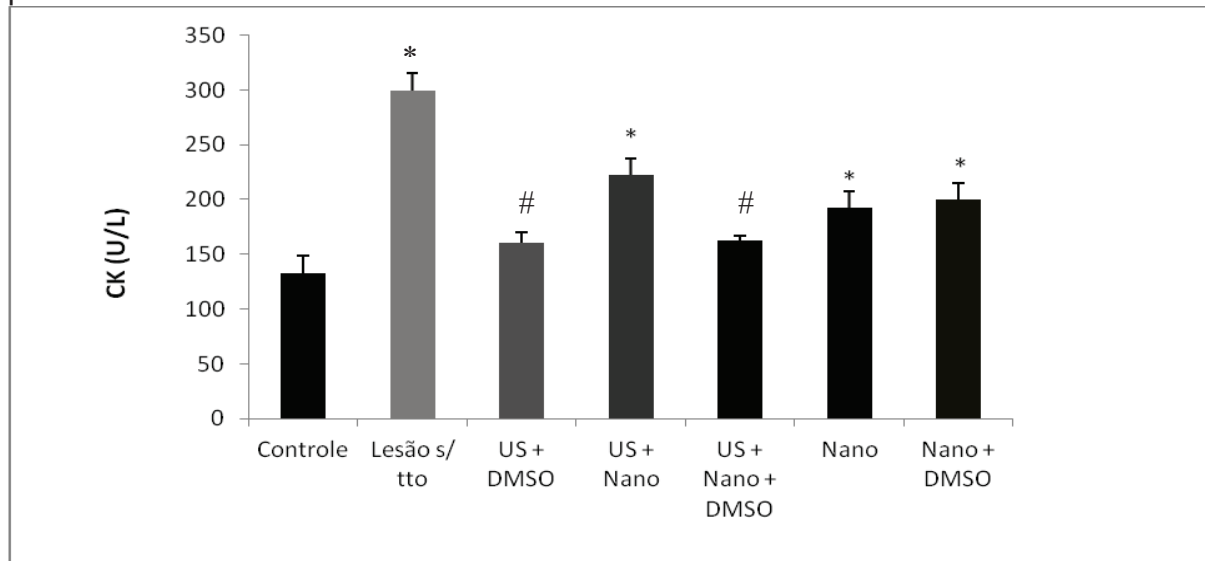
Glutathione peroxidase (GPX): A GPX é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do H₂O₂ e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H₂O e álcool, usando a glutathione (GSH) (como doador de elétrons). A determinação da atividade da glutathione peroxidase (GPX) é feita a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotômetro (340nm). ⁽¹²⁾

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de p<0,05. Foi utilizado o SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 16.0 como pacote estatístico.

RESULTADOS

A figura 1 apresenta a relação da atividade da CKu/l em músculo esquelético após lesão causada por exercício excêntrico.

Figura 1. A atividade da CKu/l em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.

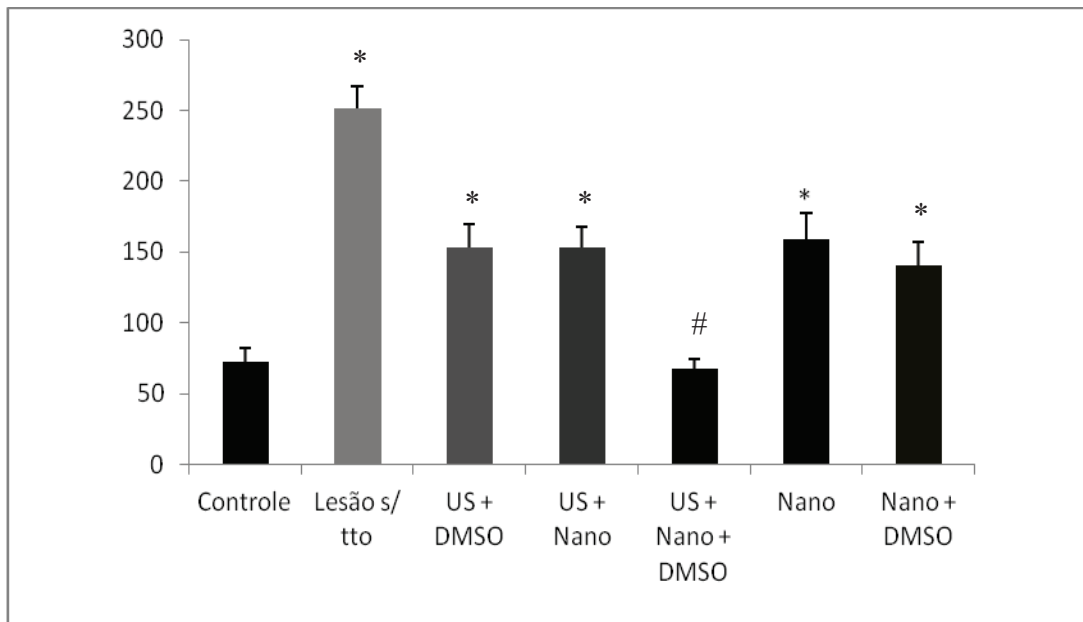


* vs controle; # vs *; $p \leq 0,05$

Os resultados apontam para um aumento na CK nos grupos lesão sem tratamento, US + NANO, NANO e NANO + DMSO, quando comparado ao grupo controle, e uma diminuição no grupo (US + DMSO e US + DMSO + NANO) quando comparado ao grupo lesão sem tratamento.

A figura 2 apresenta a relação entre a produção de ânion superóxido em músculo esquelético de ratos após lesão causada pelo exercício excêntrico.

Figura 2. Níveis de produção de ânion superóxido em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.

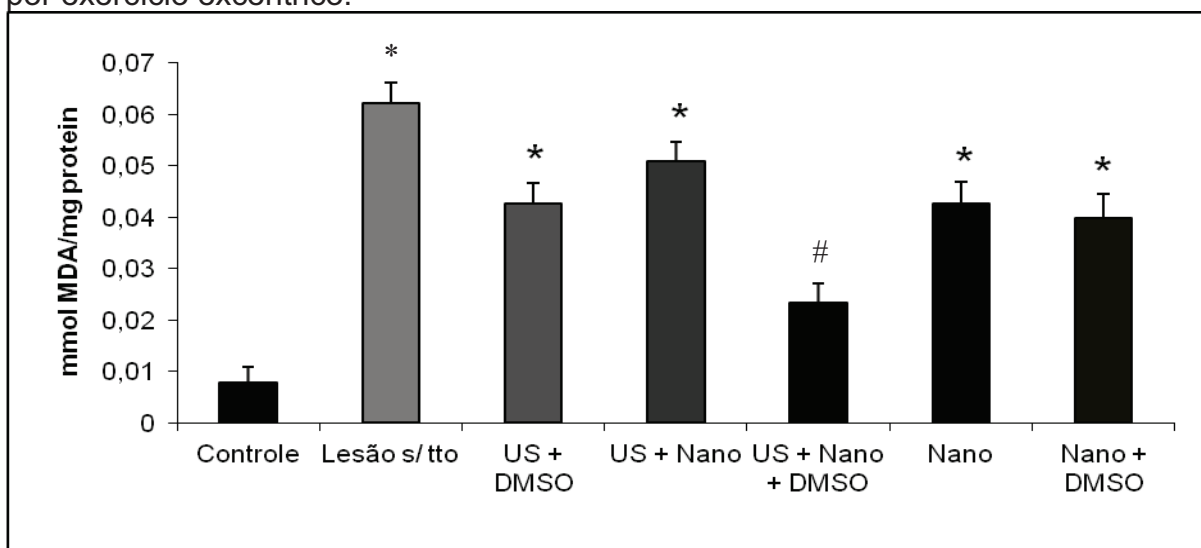


* vs controle; # vs *; $p \leq 0,05$

De acordo com a figura 2, houve um aumento significativo na produção de superóxido no grupo lesão sem tratamento, US + DMSO, US + NANO, NANO e NANO + DMSO em relação ao grupo controle, contudo, o grupo US + DMSO + NANO diminuiu a produção de anion em relação ao grupo lesão sem tratamento.

A figura 3 apresenta os níveis de TBARS em músculo esquelético de ratos após lesão causada pelo exercício excêntrico.

Figura 3. Níveis de TBARS em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.

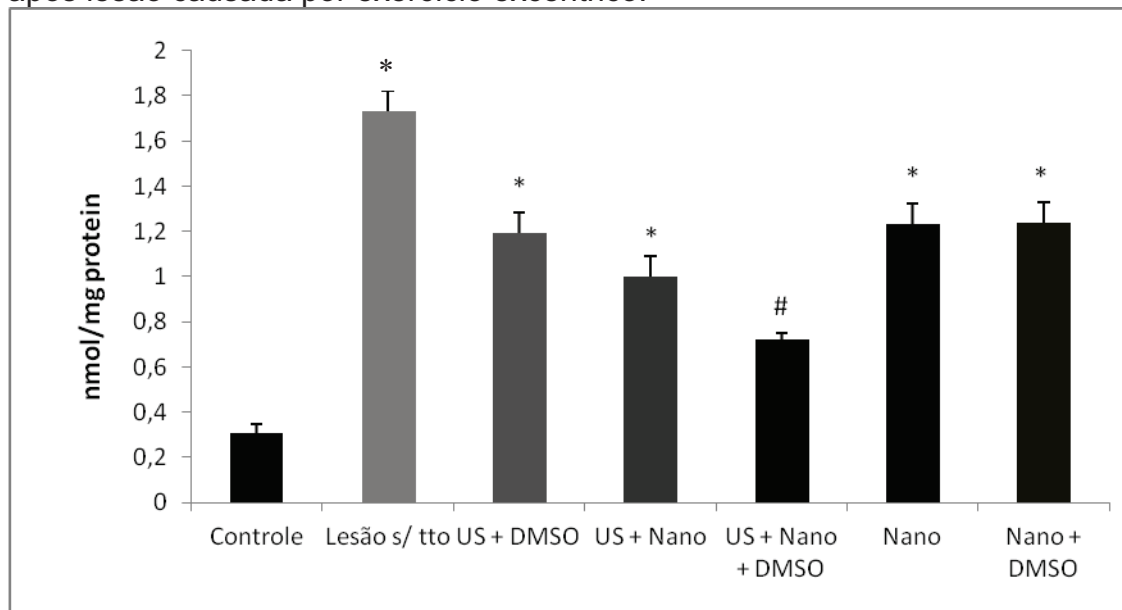


* vs controle; # vs *; $p \leq 0,05$

De acordo com a figura 3 houve aumento nos níveis de TBARS no grupo lesão sem tratamento, US + DMSO, US + NANO, NANO e NANO + DMSO e uma diminuição no grupo US + DMSO + NANO quando comparado ao grupo lesão sem tratamento.

A figura 4 analisa os níveis de carbonilação de proteínas em músculo esquelético de ratos após lesão causada pelo exercício excêntrico.

Figura 4. Níveis de carbonilação de proteínas em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.

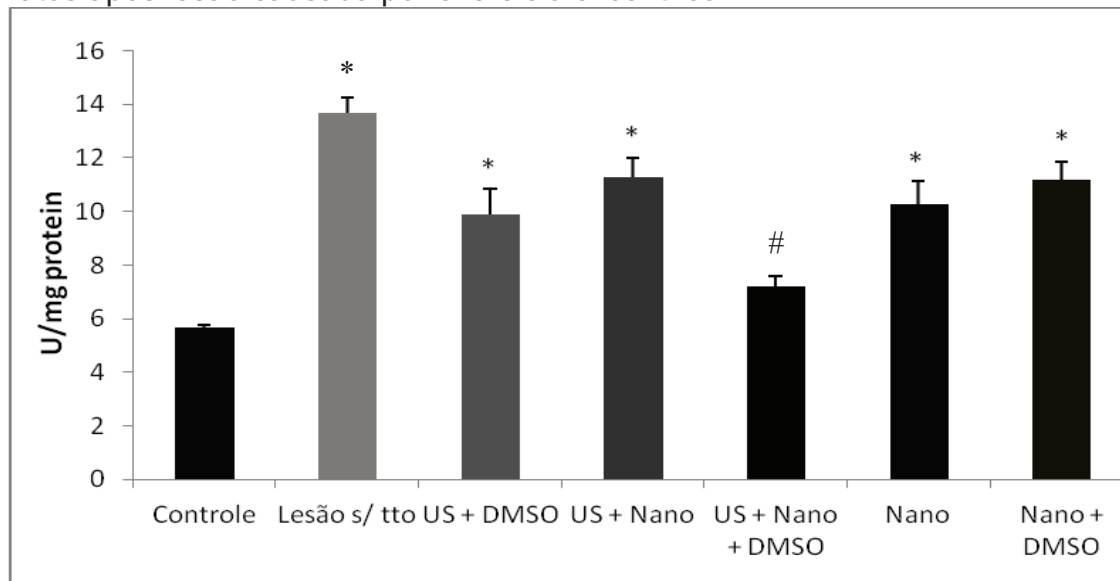


* vs controle; # vs *; $p \leq 0,05$

Conforme mostrado na figura 4 houve um aumento na carbonilação de proteínas em todos os grupos quando comparado ao grupo controle, porém, o grupo US + DMSO + NANO teve uma diminuição significativa na carbonilação de proteínas quando comparado ao grupo lesão sem tratamento.

A figura 5 apresenta a atividade da superóxido dismutase (SOD) em músculo esquelético de ratos após lesão causada pelo exercício excêntrico.

Figura 5. Atividade da superóxido dismutase (SOD) em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.

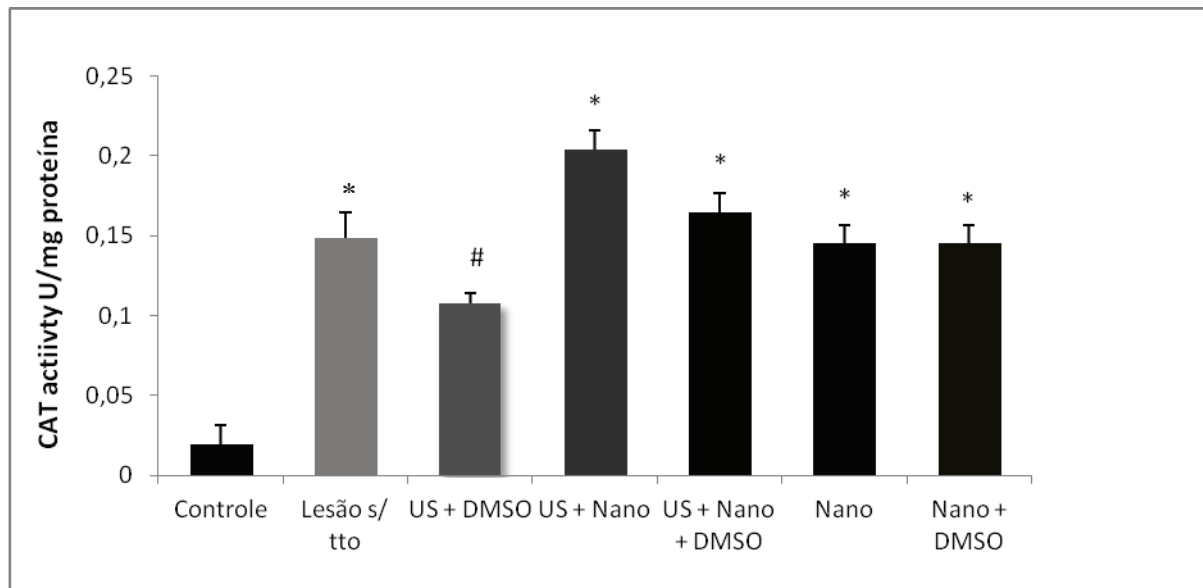


* vs controle; # vs *; $p \leq 0,05$

A figura 5 demonstra um aumento nas atividades da SOD após o exercício excêntrico nos grupos lesão sem tratamento, US + DMSO, US + NANO, NANO e NANO + DMSO quando comparado ao grupo controle. Observamos que só o grupo US + NANO + DMSO mostrou uma diminuição significativa nos níveis da SOD quando comparado ao grupo lesão sem tratamento.

A figura 6 apresenta a atividade da CAT em músculo esquelético de ratos após lesão causada pelo exercício excêntrico.

Figura 6: Atividade da catalase em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.

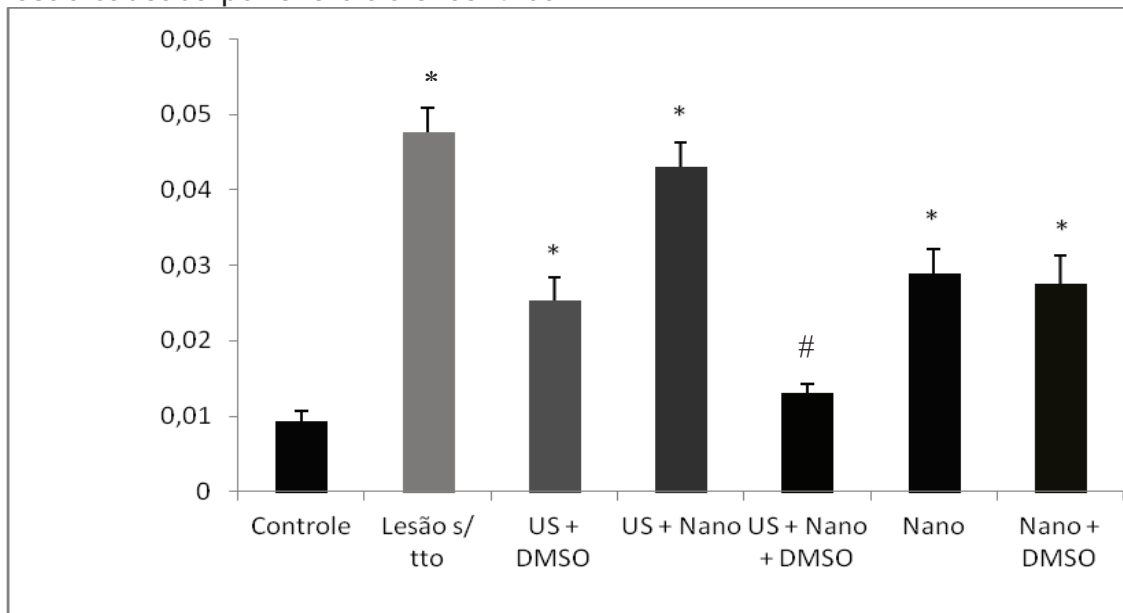


* vs controle; # vs *; $p \leq 0,05$

A figura 6 demonstra um aumento na atividade da CAT após o exercício excêntrico no grupo lesão sem tratamento, US + NANO, US + NANO + DMSO, NANO e NANO + DMSO quando comparado ao grupo controle e que só o grupo US + DMSO mostrou uma diminuição significativa nos níveis da CAT quando comparado ao grupo lesão sem tratamento.

A figura 7 apresenta a ativação da glutathione peroxidase em músculo esquelético de ratos após lesão causada pelo exercício excêntrico.

Figura 7. Ativação da glutatona peroxidase em músculo esquelético de ratos após lesão causada por exercício excêntrico.



* vs controle; # vs *; $p \leq 0,05$

De acordo com a figura 8 os resultados demonstraram um aumento nas atividades da GPX após o exercício excêntrico nos grupos lesão sem tratamento, US + DMSO, US + NANO, NANO e NANO + DMSO quando comparado ao grupo controle, o grupo US + NANO + DMSO mostrou uma diminuição significativa nos níveis da GPX quando comparado ao grupo lesão sem tratamento.

DISCUSSÃO

O exercício excêntrico induz o dano muscular e altera os marcadores de estresse oxidativo ⁽¹³⁾. Após a lesão muscular a regeneração pode ser mais lenta ou aumentada dependendo da terapia utilizada e duração da intervenção ⁽¹⁴⁾. Sendo assim presume-se com o nosso estudo que a terapia com o ultrassom terapêutico aplicado na forma pulsada associado ao dimetilsulfóxido (DMSO) e a nanopartículas de ouro (fonoforese) pode atenuar esses efeitos ⁽¹⁴⁾. O exercício excêntrico induz a lesão muscular evidenciado pela perda de força e amplitude de movimento (ADM), dor muscular de início retardado (DMT), inchaço e aumento da atividade de CK sérica, a lesão inicial é atribuída a perturbação mecânica da fibra, e os danos subseqüentes estão ligados a processos inflamatórios e às mudanças no acoplamento excitação-contração no músculo, deixando-o menos vulnerável ⁽¹⁵⁾.

O UTP tem sido utilizado visando a diminuição dos sinais da inflamação e acelerando o processo de regeneração ⁽¹⁴⁾. O uso isolado do ultrassom acelera o processo de recuperação após a lesão muscular, entretanto esses efeitos podem ser potencializados com o uso de agentes farmacológicos que irão facilitar a passagem de agentes secundários estimulando a proliferação de células satélites ⁽¹⁶⁾.

O DMSO é normalmente usado como um antioxidante ou como um solvente para muitos tipos de drogas, apresenta um efeito sobre a miosina pela atividade da ATPase, assim ele influencia positivamente a actina e reguladores de proteínas ⁽¹⁷⁾.

As nanopartículas de ouro são capazes de facilitar o carreamento de moléculas grandes sem que aja alteração no carreamento das pequenas moléculas. Isso potencializa a ação de alguns fármacos ⁽¹⁸⁾.

Devido as características do UTP, sua utilização pode ser associada com fármacos antioxidantes e antiinflamatórios (Fonoforese), com o objetivo de potencializar os efeitos cicatrizantes dessas duas terapias ⁽¹⁹⁾.

Os resultados do presente estudo mostraram uma elevação da atividade da CK, reduzido significativamente nos grupos US + DMSO e US + DMSO + NANO quando comparado ao grupo lesão sem tratamento, provavelmente devido à diminuição do dano muscular. O ultra-som pulsado acelera o processo regenerativo

⁽¹⁴⁾, mostrando grande efetividade quando aliado ao DMSO e a nanopartículas de ouro proporcionado pelo aumento da permeabilidade celular. Vários estudos mostram que o exercício excêntrico provoca estresse oxidativo⁽¹³⁾.

A geração de ERO pelos músculos em exercício é confirmada pela liberação de ânion superóxido e óxido nítrico no meio extracelular e por um aumento dos biomarcadores oxidativos, como carbonilação de proteínas e ácido tiobarbitúrico⁽¹³⁾.

Na figura 2 a produção de anion aumentou consideravelmente nos grupos US + DMSO, US + NANO, NANO e NANO + DMSO e apenas o grupo US + NANO + DMSO não apresentou esse aumento mostrando que o tratamento com US + NANO + DMSO diminuiu a produção de anion superóxido, isso pode ter relação com a diminuição da resposta inflamatória estimulada pelo por essas três terapêuticas, a inflamação aguda no tecido é uma resposta imediata do organismo, caracteriza-se pelo rápido aumento do fluxo sanguíneo local e pela exacerbação de neutrófilos para o local da inflamação⁽²⁰⁾. Sendo assim a diminuição do ânion superóxido observada na figura 2 pode estar relacionada ao fato de o DMSO bloquear os íons cálcio inibindo a atividade da xantina oxidase, e reduzindo a produção de ERO⁽²¹⁾. Aliado a nanopartículas de ouro que através da sua composição química, forma e tamanho se caracterizam por conseguir se ligar as proteínas fazendo com que estas, por sua vez, consigam uma interação maior com as células⁽²²⁾, tudo isso sendo utilizado através do ultrassom que já tem a sua eficácia de forma isolada comprovada⁽⁴⁾.

Peroxidação lipídica é considerada um evento crucial da ação citotóxica da ERO⁽²³⁾. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com outros trabalhos demonstrando aumento na peroxidação lipídica e oxidação de proteínas após EE⁽¹³⁾, e esses danos oxidativos diminuíram significativamente quando analisados apenas os grupos US+NANO+DMSO.

O ultrassom transmite ondas mecânicas que irão aplicar uma espécie de estresse nos tecidos, promovendo a síntese de proteína e cálcio em diferentes células, levando ao aumento da penetração de agentes antiinflamatórios através da fonoforese devido a cavitação (geração de bolhas de gás que oscilam e podem implodir na superfície da pele ajudando na penetração do agente utilizado⁽⁴⁾.

Segundo Deng, 2010 as nanopartículas de ouro são eficazes na neutralização da ERO, incluindo o peróxido de hidrogênio o radical anion superóxido. Através da sua composição química, forma e tamanho, as nanopartículas se caracterizam por conseguirem se ligar às proteínas fazendo com que estas, por sua vez, consigam uma interação maior com as células. É possível que o efeito do DMSO na liberação de cálcio auxilie na redução do dano oxidativo em proteínas e lipídios.

O crescimento das atividades das enzimas antioxidantes no músculo esquelético em resposta a lesão muscular está associada com a produção de ROS⁽²⁰⁾. No presente estudo, a atividade da SOD e GPX mostraram um aumento no grupo lesão sem tratamento quando comparado ao grupo controle, e diminuição do grupo UTP+NANO+DMSO em relação ao grupo lesão sem tratamento, UTP+DMSO diminuem a atividade antioxidante após lesão causada por trauma mecânico⁽¹⁴⁾, é possível que essa diminuição na atividade das enzimas ocorra em resposta a terapia (UTP+NANO+DMSO), haja vista a diminuição dos danos oxidativos após o tratamento. Provavelmente elas aumentaram em virtude de que o quadríceps estava num ambiente de estresse oxidativo⁽²⁴⁾, observamos que a atividade da SOD no grupo treinado foi maior do que no grupo controle, sendo assim somente o grupo US+NANO+DMSO (fonoforese) teve a diminuição dessas enzimas, e o que fortalece essa ideia é o fato de que os danos em lipídeos e proteínas também baixaram, sendo assim, podemos acreditar que a terapia modulou a diminuição do dano por ativar proteases, e outros mecanismos de defesa.

É possível que o efeito do DMSO na liberação de cálcio⁽⁵⁾ pode também justificar esta redução de prevenção da formação de ROS. Além disso, o UTP altera a atividade das plaquetas, neutrófilos e macrófagos envolvidos na fase inflamatória do processo de cicatrização do músculo, acelerando este processo. Outro efeito é o aumento na velocidade da angiogênese⁽⁶⁾. Ultrassom + DMSO diminuem a atividade antioxidante após lesão causada por trauma mecânico⁽¹⁴⁾, Em um estudo recente resultados mostraram que a administração de nanopartículas de cério (CeO₂) antes e depois da indução da hepatotoxicidade diminuem o estresse oxidativo⁽²⁵⁾.

Em relação à atividade antioxidante da catalase, os resultados mostram uma elevação na atividade da CAT nos grupos US+NANO, US+NANO+DMSO,

NANO E NANO+DMSO em relação ao grupo controle, e apenas o grupo US+DMSO teve uma diminuição significativa em relação ao grupo lesão sem tratamento, é possível que a alta produção de superóxido tenha tido efeito inibitório oxidando esta enzima, conseqüentemente inativando sua ação no grupo lesão sem tratamento ⁽²⁴⁾. De acordo com os nossos resultados, Aebi também demonstrou desequilíbrio entre as atividades enzimáticas da catalase e da superóxido dismutase. Contudo, a atividade da GPX demonstrou um aumento suprimindo a inibição da catalase. Com isso podemos concluir que o DMSO e as nanopartículas de ouro são eficazes na redução da lesão muscular e do estresse oxidativo somente quando utilizados através do ultrassom, estudos adicionais com outros tipos de lesões musculares são necessários para elucidar o exato mecanismo dessa terapia.

REFERÊNCIAS

- ¹ ELMALI, N; et al. **Effects of resveratrol on skeletal muscle in ischemia-reperfusion injury.** Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 2007;13:274–280.
- ² POWERS, S.K; HOWLEY, E.T. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho.** 3. ed. São Paulo: Manole, 2000.
- ³ ARMSTRONG, R.B; WARREN, G.L; WARREN J.A. Mechanisms of exercise-induced muscle fiber injury. **Sports Med.** 1991.
- ⁴ KAHN, J. **Princípios e práticas de eletroterapia.** 4 ed. São Paulo: Santos, 2001.
- ⁵ VELASCO, R.; TRUJILLO, X; VASQUEZ, C. Effect of dimethylsulfoxide on excitation-contraction coupling in chicken slow skeletal muscle. **J Pharmacol Sci** 2003;93:149–154.
- ⁶ FREITAS; L.S; FREITAS; T.P; SILVEIRA; P.C. **Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury.** Cell Biology International, 2007.
- ⁷ MCCORD, J.M; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymatic Function for erythrocyte (hemocuprein). **J. Biol. Chem.** 1969, 244:6049–6055.
- ⁸ DRAPER, H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Meth. Enzymol** 1990, 186:421-431.
- ⁹ LEVINE; R.L; et al Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Meth Enzymol** 1990, 186:464-478.
- ¹⁰ BANNISTER; J.V; CALABRESE; L. Assays for SOD. **Meth. Biochem. Anal** 1987, 32:279-312.
- ¹¹ AEBI, H. Catalase in vitro. **Meth Enzymol** 1984, 105:121-126.

- ¹² FLOHÉ, I; GUNZLER, W. Assays of glutathione peroxidase. **Methods enzymol.** V. 105, p. 114-21, 1984.
- ¹³ SILVA, L.A.; et al. Nacetylcysteine supplementation and oxidative damage and inflammatory response after eccentric exercise. **International Journal of Sports Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 18, p. 379-88, 2008.
- ¹⁴ SILVEIRA, P.C, VICTOR, E.G, SCHEFER, D. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. **Ultrasound Med Biol.** 2010 Jan;36(1):44-50.
- ¹⁵ CLARKSON, P.M, HUBAL, M.J. **Am J Phys Med Rehabil.** 2002 Nov;81 (11 Suppl):S52-69. Review.
- ¹⁶ MARKERT; C.D. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. **Arch Phys Med Rehabil**, 2005;86:1304–1310.
- ¹⁷ MARIANO, A.C; ALEXANDRE, G.M.C; SILVA, L.C. Dimethylsulfoxide enhances the effects of Pi in myofibrils and inhibits the activity of rabbit skeletal muscle contractile proteins. **Biochem J.** 2001;358:627–636.
- ¹⁸ GHOSH, P,et al. **Adv Drug Deliv Rev.** 2008 Aug 17;60(11):1307-15. Epub 2008 Apr 10.
- ¹⁹ HILL, G.E; FENWICK, S; MATTHEWS, B.J. **Ultrasound in medicine & biology** 31: 1701–1706. 2005.
- ²⁰ PANSARASA, O; et al. Agedependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. **Free Radic Biol Med** 1999;27:617–622.

²¹ RAMIREZ-SILVA, L; ORIA-HERNANDEZ. Selectivity of pyruvate kinase for Na⁺ and K⁺ in water/dimethylsulfoxide mixtures. **J Eur J Biochem.** 2003;270:2377–2385.

²² DENG, Z.J; et al. **Nat Nanotechnol.** 2011 Jan;6(1):39-44.

²³ JURANEK, I; BEZEK, S. Controversy of free radical hypothesis: Reactive oxygen species – Cause or consequence of tissue injury? **Gen Physiol Biophys** 2005;24:263–278.

²⁴ PINHO, R.A; et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. **Cell Biol Int.** 2006;10:848–853.

²⁵ Amin KA, Hassan MS, Awad el-ST, Hashem KS. The protective effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline. **Int J Nanomedicine.** 2011 Jan 17;6:143-9.

CAPÍTULO III – NORMAS DA REVISTA

Escopo e política

A Revista Brasileira de Medicina do Esporte (RBME) é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Exercício e 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, 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 2010, está disponível na internet (<http://www.icmje.org>).

DUPLA SUBMISSÃO

Os artigos submetidos a RBME serão considerados para publicação somente com a condição de que não tenham sido publicados ou não 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), 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 número 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 (número 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 número 6.638, de 8 de maio de 1979; e Decreto número 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 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. Considerando o crescente número de submissões à RBME, artigos serão também avaliados quanto à sua relevância no que tange à contribuição para o conhecimento específico na área. Assim, artigos com adequação metodológica e resultados condizentes poderão não ser aceitos para publicação quando julgados como de baixa relevância pelos Editores. Tal decisão de recusa não estará sujeita a recurso ou contestação por parte dos autores. 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 (layout) em formato eletrônico serão enviadas, por e-mail, para o autor responsável pelo artigo. Os autores deverão devolver, também por e-mail, a prova gráfica (layout) com as devidas correções em, no máximo, 48 horas após o seu recebimento. O envio e o retorno das provas gráficas por correio eletrônico visa agilizar o processo de revisão e posterior publicação das mesmas.

DIREITOS AUTORAIS

Todas as declarações publicadas nos artigos são de inteira responsabilidade dos autores. Entretanto, todo material publicado torna-se propriedade da SBME, que

passa a reservar os direitos autorais. Portanto, nenhum material publicado na RBME poderá ser reproduzido sem a permissão por escrito da SBME. 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

Revista Brasileira de Medicina do Esporte SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA DO EXERCÍCIO E DO ESPORTE Avenida Brigadeiro Luis Antônio, 278 6 andar 01318-901 São Paulo, SP Tel./fax: (11) 3106 7544 / Fax: (11) 3106 8611 E-mail: sbme@medicinadoesporte.org.br

Forma de preparação dos manuscritos

O artigo submetido deve ser digitado em espaço duplo, fonte arial 12, papel tamanho A4 ou ofício, com margens de 2,5cm, sem numerar linhas ou parágrafos, e numerando as páginas no canto superior direito. Gráficos e tabelas devem ser apresentados no final do artigo em páginas separadas, assim como as legendas das figuras. As figuras devem ser incluídas em arquivos individuais. No corpo do texto deve-se informar os locais para inserção dos gráficos, tabelas 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.

FORMATO DOS ARQUIVOS

Para o texto, usar editor de texto do tipo Microsoft Word para Windows ou equivalente

Não enviar arquivos em formato PDF. As figuras deverão estar nos formatos jpg ou tif. Deverão estar incluídas no arquivo Word, mas também devem ser enviadas separadamente (anexadas durante a submissão do artigo como documento suplementar).

ARTIGO ORIGINAL

Um artigo original deve conter no máximo 30 (trinta) referências e 20 (vinte) páginas 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; áreas de formação 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. A titulação dos autores não deve ser incluída.

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 a versão 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 modificados; (6) quando pertinente, incluir a análise estatística utilizada, bem como os programas 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 sequência 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 em que aparecem no texto, em formato sobrescrito entre parênteses. As referências citadas somente em legendas de tabelas ou figuras devem ser numeradas de acordo com uma sequência 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 Indexed: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>)*. Se o periódico não constar dessa lista, deve-se utilizar a abreviatura sugerida pelo próprio periódico. 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 for Alzheimers disease on chromosome 21. *Lancet* 1989;1:352-5.

2) Autor institucional: The Royal Marsden Hospital Bone-Marrow Transplantation 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 WJ. *Sports injuries and their treatment*. 2 nd 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 Atha Editora (atharbme@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, linhas 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 para 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. Artigos de revisão deverão abordar temas específicos com o objetivo de atualizar os menos familiarizados com assuntos, típicos 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. A inadequação de qualquer um dos itens acima acarretará na recusa do artigo pelos

editores, sem que o mesmo seja enviado para o processo de revisão pelos pares. O artigo de revisão deve ter, no máximo, 30 (trinta) páginas e 100 (cem) referências.

REVISÃO SISTEMÁTICA

A RBME encoraja os autores a submeterem artigos de revisão sistemática da literatura nas áreas de Medicina e Ciências do Exercício e do Esporte. O Conselho Editorial avaliará a qualidade do artigo, a relevância do tema escolhido, o procedimento de busca e os critérios para inclusão dos artigos. A inadequação de qualquer um dos itens acima acarretará na recusa do artigo pelos editores, sem que o mesmo seja enviado para o processo de revisão pelos pares. O artigo de revisão sistemática deve ter, no máximo, 30 (trinta) páginas e 100 (cem) referências.

META-ANÁLISE

A RBME encoraja os autores a submeterem artigos de análise meta-analítica nas áreas de Medicina e Ciências do Exercício e do Esporte. O Conselho Editorial avaliará a qualidade do artigo, a relevância do tema escolhido, o procedimento de busca de artigos, os critérios para inclusão dos artigos e o tratamento estatístico utilizado. A inadequação de qualquer um dos itens acima acarretará na recusa do artigo pelos editores, sem que o mesmo seja enviado para o processo de revisão pelos pares. O artigo de meta-análise deve ter, no máximo, 30 (trinta) páginas e 100 (cem) referências.

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. O artigo de opinião deve ter, no máximo, 20 (vinte) páginas e 20 (vinte) referências.

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 ou das Ciências do Esporte a partilhá-la, sob a forma de um Relato de Experiência. A inadequação de qualquer um dos itens acima acarretará na recusa do artigo pelos editores, sem que o mesmo seja enviado para o processo de revisão pelos pares. O relato de experiência deve ter, no máximo, 15 (quinze) páginas e 15 (quinze) referências.

RELATO DE CASO

A RBME pode aceitar 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; 2) 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. O relato de caso deve ter, no máximo, 20 (vinte) páginas e 30 (trinta) referências.

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 a sua apreciação. Contudo, os livros recebidos e não apreciados serão listados no último número de cada ano da Revista. Os livros selecionados para apreciação serão encaminhados para revisores com experiência e competência profissional na respectiva área do livro, cujos pareceres deverão ser emitidos em até três meses e 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

Todos os artigos deverão ser submetidos diretamente no site <http://submission.scielo.br/index.php/rbme>. Na submissão eletrônica do artigo, os autores deverão anexar como Documento Suplementar:

- Termo de Divulgação de Potencial Conflito de Interesses
- Termo de Transferência de Direitos Autorais (a seguir) Não serão aceitas submissões por e-mail, correios ou quaisquer outras vias que não a submissão eletrônica no site supramencionado.