

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE SAÚDE E BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOCÊNCIAS**

YESUDIAN YAMADA DA GAMA

**EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASE-I EM LESÃO MUSCULAR DE RATOS
SUBMETIDOS À ATIVIDADE FÍSICA**

**CURITIBA
2013**

YESUDIAN YAMADA DA GAMA

**EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASE-I EM LESÃO MUSCULAR DE RATOS
SUBMETIDOS À ATIVIDADE FÍSICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia– PPGO – PUCPR – da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª Ana Maria Trindade Grégio

**CURITIBA
2013**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

G184e
2013 Gama, Yesudian Yamada da
Expressão de metaloproteinase-I em lesão muscular de ratos submetidos à
atividade física / Yesudian Yamada da Gama ; orientadora, Ana Maria Trindade
Grécio. – 2013.
33 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2013
Inclui bibliografias
Texto em português e inglês

1. Metaloproteinase 1 da matriz. 2. Enzimas. 3. Exercícios físicos. 4. Sistema
musculoesquelético - Ferimentos e lesões. 5. Odontologia. I. Grégio, Ana Maria
Trindade. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-
Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.6



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE APROVAÇÃO

YESUDIAN YAMADA DA GAMA

EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASE-1 EM LESÃO MUSCULAR DE RATOS SUBMETIDOS À ATIVIDADE FÍSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Biociências**.

Orientador(a):

Profª Drª Ana Maria Trindade Grégio
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Profª Drª Maria Ângela Naval Machado
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR

Curitiba, 04 de julho de 2013.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha mãe Elisabeth Yamada e ao meu pai Uberto Gama por sempre estarem do meu lado e por terem me dado à oportunidade de estudar e escolher a profissão que eu sempre quis, mesmo sabendo que não seria fácil, eles me ensinaram que, quando gostamos do que fazemos, vamos longe.

Quero agradecer à minha noiva Ana Paula de Andrade, que sempre me apoiou e me incentivou a não desistir, que sempre esta do meu lado todos os dias, nos momentos bons e ruins, sem ela não teria chego até aqui.

Agradeço a todos os professores que cruzaram meu caminho, desde a escola Stella Maris, ensino médio OPET e Dom Bosco, faculdade Dom Bosco e especialização PUCPR. São muitos nomes para colocar aqui, mas todos têm seus méritos e nunca esquecerei.

As minhas orientadoras Ana Maria Trindade Grégio e Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, que me conduziram durante todo o mestrado, e mesmo eu estando em uma área diferente da minha formação, me fizeram escrever e me levaram a congressos, sempre com muita paciência e compreensão durante todo o percurso.

Não posso esquecer também do professor Edvaldo Rosa, que me apoiou também desde o início do mestrado, e que deu dicas importantes durante o processo, nos ensinou a escrever artigos e capítulos de livros.

Por fim existem muitas pessoas que gostaria de agradecer, mas ficaria muito extenso, então quero agradecer a todos os meus amigos, alunos e familiares.

Nada nessa vida é fácil, mas quando temos um objetivo, deve-se ter foco e ir até o fim!

Obrigado!!!

SUMÁRIO

1ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	1
PÁGINA TÍTULO.....	2
RESUMO.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
MÉTODO.....	5
RESULTADOS.....	8
DISCUSSÃO.....	10
CONCLUSÃO.....	12
REFERÊNCIAS.....	13
TABELAS.....	15
2ARTIGO EM INGLES.....	16
TITLE PAGE.....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUCTION.....	19
METHOD.....	20
RESULTS.....	21
DISCUSSION.....	25
REFERENCES.....	26
3ANEXOS.....	28
COMITE DE ÉTICA.....	28
NORMAS DA REVISTA.....	29

PÁGINA TÍTULO

Expressão de Metaloproteinase-1 em Lesão Muscular de Ratos Submetidos à Atividade Física.

YY Gama, AMT Grégio

**Departamento de Biociências, Programa de Pós-graduação em Odontologia,
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.**

Endereço para correspondência: rua Imaculada Conceição, 1155 CEP 80215-901 –

Curitiba – Paraná, Brasil – Fone: 41 3271-1637 – Fax: 41 3271-1405

Email: yesudianyamada@hotmail.com

Palavras-chave: úlcera, metaloproteinase, colágeno, atividade física.

RESUMO

A MMP-1 é uma enzima, cuja função é a degradação dos colágenos tipo I e III, envolvidos no processo de reparo de feridas. O presente estudo teve por objetivo verificar a expressão da MMP-1 no processo de reparo de feridas frente ao exercício físico. As úlceras foram quimicamente induzidas no gastrocnêmio de ratos submetidos à natação e em ratos sedentários. Foi no grupo treinado e sedentário, realizada a avaliação imunohistoquímica utilizando anti-MMP-1. O grupo treinado foi submetido à natação 5 vezes semanais por 60 minutos, durante 6 semanas. Os animais treinados demonstraram diminuição da expressão de MMP-1 aos 14 dias. Aos 21 dias foi observada uma maior expressão da MMP-1 no grupo treinado em relação ao sedentário. Concluiu-se que a atividade física pode alterar a expressão da MMP-1, retardando o processo de reparo de feridas aos 14 dias.

ARTIGO

EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASE-1 EM LESÃO MUSCULAR DE RATOS SUBMETIDOS A NATAÇÃO

YESUDIAN YAMADA DA GAMA

Mestrando em Odontologia - Área de Concentração em Biociências

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.

Escola de Saúde e Biociências

Programa de Pós-graduação em Odontologia

Email: yesudianyamada@hotmail.com

ANA MARIA TRINDADE GRÉGIO

Professora Titular do Programa de Pós-graduação em Odontologia

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.

Escola de Saúde e Biociências

Email: ana.gregio@pucpr.br

Endereço para Correspondência

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Trindade Grégio

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.

Escola de Saúde e Biociências

Programa de pós-graduação em Odontologia–Área de Concentração em Estomatologia

Rua Imaculada Conceição, 1155, Bairro Prado Velho, CEP 80215-901 – Curitiba, PR. Fone: 55 41 3271-1637/Fax 55 41 3271-1405

Email: ana.gregio@pucpr.br

INTRODUÇÃO

Para que o processo de reparo ocorra, é necessário inicialmente que o tecido lesionado seja degradado. Após essa degradação, fibroblastos sintetizam fibras colágenas tipo III. Em uma fase mais avançada, o colágeno tipo III depositado é substituído pelo colágeno tipo I. Essa substituição se inicia em média aos 10 dias. (BALBINO et al. 2005). Tanto para a degradação do tecido lesionado, quanto para a degradação e substituição dos colágenos é necessária à ativação de algumas enzimas, as metaloproteinases (MMP) (MCLENNAN, 2008).

Existem cerca de 20 MMP que são divididas em cinco grupos, a saber: collagenases, estromelisinases, gelatinases, matrilisinas e MMPs ligadas à membrana plasmática (PEREIRA et al. 2005; MCLENNAN, 2008; VERMA, 2007).

A MMP-1, uma collagenase intersticial, é a metaloproteinase mais abundante e está diretamente ligada ao processo de remodelação (Warhonowicz et al. 2007). Quando ocorre uma lesão, essa MMP-1 degrada o colágeno intersticial remanescente do tipo I (maduro), abrindo espaço para a formação de colágeno III (imaturo) depositado por fibroblastos. A subsequente substituição de colágeno III para o I, que é mais resistente, também ocorre com a participação MMP-1. Esta MMP-1 é sintetizada por uma variedade de tipos celulares, incluindo células epiteliais, mesenquimais, inflamatórias, neoplásicas e fibroblastos (MCLENNAN et al. 2008; JUCÁ et al. 2008).

Estudos prévios verificaram alteração da MMP-1 após o exercício físico (LI et al 2009), que verificou, por meio do PCR, redução da MMP-1 no músculo cardíaco de ratos submetidos a natação. Mammi et al (2011) também verificaram, por meio da avaliação sérica, redução da MMP-1 em voluntários que realizaram exercício físico em cicloergômetro. Entretanto, em exercícios de curta duração, foi verificado, por meio de coleta de sangue utilizando imuno-histoquímica, um aumento da expressão de MMP-1 (URSO et. Al. 2009). Cappelli et al (2009) também verificaram, por meio de PCR em amostras de sangue, um aumento na expressão gênica do MMP-1 logo após uma única sessão de exercício físico de alta intensidade. Entretanto, nenhum estudo avaliou a expressão da MMP-1 em úlceras de ratos submetidos ao treinamento físico.

Em estudo prévio¹(não publicado) foi verificado, em ratos com úlcera induzida, uma maior expressão de colágeno tipo III aos 14 dias, comparando animais submetidos ao treinamento físico com sedentários. Diante desse achado, o objetivo deste estudo foi analisar se a expressão da MMP-1, que é responsável pela clivagem do colágeno tipo I e III, além da remodelação, poderia ter influência nessa maior expressão de colágeno tipo III aos 14 dias em animais submetidos ao treinamento físico.

MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em uso de animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná conforme o parecer: CEUA/PUCPR–297/07.

A amostra foi constituída de blocos processados e arquivados no laboratório de patologia experimental da PUCPR de estudo prévio (não publicado) de Namba & Grégio (2009)¹. Para tanto foram utilizados 62 ratos Wistar adultos machos, divididos em dois grupos: grupo treinado com lesão muscular (GT) e grupo sedentário com lesão muscular (GS).

Atividade Física

A atividade física escolhida foi a natação, e inicialmente, por uma semana foi realizada a adaptação dos animais do grupo treinado ao ambiente aquático, iniciando o treinamento com 20 min e acrescentado 10 min diários para que ao quinto dia os animais já estivessem nadando por 60 min. Após a adaptação, foi acrescentada ao treinamento uma carga equivalente a 5% do peso corporal acoplada ao tórax do animal com fita adesiva. Os treinos tiveram duração de 60 min diários, com frequência de cinco dias por semana, com duração total de 6 semanas. O treino se iniciou às 8:00 da manhã e era utilizado um recipiente de amianto (100cm x 70cm x 60cm) com coluna de água de 40cm, para evitar que os ratos apoiem a cauda no fundo do recipiente. A temperatura da água era mantida em $32 \pm 1^\circ \text{C}$. Após o término das sessões de natação, os ratos eram enxugados e levados às suas respectivas gaiolas em uma sala com temperatura de 25°C .

O grupo controle foi submetido ao meio aquático apenas para simular as condições do grupo treinado, porém não foram treinados.

Ulceração do gastrocnêmio

1

Namba EL; Grégio, AMT. Efeito da atividade física sobre o processo de reparo de lesões do músculo gastrocnêmio de ratos. 2009. 64, [2] f. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2009.

A ulceração no gastrocnêmico dos animais foi realizada após o período de adaptação da atividade física. A úlcera foi induzida por meio da aplicação subcutânea de NaOH 40%. Os animais eram anestesiados com tiopental (80mg/kg) antes de realizar a ulceração. Os animais foram mortos por overdose de solução anestésica (150mg/kg) nos dias 7, 14 e 21, assim que concluída a última sessão de treino.

Reação imunohistoquímica e análise da imunomarcação

As reações imunohistoquímicas para a marcação da proteína MMP-1 foram realizadas no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR.

A partir de blocos de parafina foram obtidos cortes histológicos de 4 µm de espessura que foram estendidos sobre lâminas eletricamente carregadas (AutoWrite® Green Adhesion Slides Cut Edges, Sakura, CA, código 9546-1). As lâminas foram secas a 60 °C por 24h. A desparafinização foi feita com xilol em temperatura ambiente (2 banhos de 10 min). Em seguida, os cortes foram hidratados em etanol absoluto (3 banhos de 1 min) e etanol 80% (1 banho de 1min). Para inibir a peroxidase endógena, os cortes foram incubados em solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% e lavados em água destilada. Depois, foi realizada a recuperação antigênica, onde as lâminas foram imersas em recuperador Imuno Retraver (Dako, Carpinteria, CA) em banho-maria à 99 °C por 30 min, deixando esfriar até a temperatura ambiente, sendo então lavadas em água destilada. Em seguida as lâminas foram marcadas com a caneta Dako Pen (Dako, Carpinteria, CA, Código S2002), delimitando a área do corte.

Os cortes permaneceram imersos em tampão TBS-Tris (pH 7.3) até o momento da incubação com o anticorpo primário. Os cortes foram secos e incubados com o anticorpo primário anti-MMP-1 monoclonal de coelho, clone: EP247Y (Millipore, CA), em câmara úmida, a 4 °C, "overnight". A diluição do anticorpo em Antibody Diluent with Background-Reducing Components (DAKO Carpinteria, CA, código S302283) foi de 1:50. O controle positivo utilizado foi a placenta. O controle negativo foi obtido omitindo o anticorpo primário. Após a incubação, os cortes foram incubados em tampão TBS-Tris (pH 7.3), sendo mantido no tampão por 15 min. Em seguida os cortes foram lavados novamente com tampão; as lâminas foram secas e incubadas com Advance link (Dako, Carpinteria, CA, código K406889) por 30 min em temperatura ambiente e câmara úmida. As lâminas foram lavadas com tampão TBS-Tris (pH 7.3) e em seguida secas e incubadas em Advance enzyme (Dako Corporation, Carpinteria, CA, código K406889) por 30 min em temperatura ambiente e câmara úmida. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão TBS-Tris (pH 7.3.) A revelação da reação foi executada com a solução cromógena de 3,3'

diaminobenzidina (1:1) (DAB - Sigma Chemical, St. Louis, MO, código D7679) por 5 min. Seguiu-se a lavagem em banhos de água destilada. A contra-coloração foi feita com solução de hematoxilina de Harris, por 5 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, sendo mantidas em água por 5 min. Seguiu-se a desidratação em três banhos de etanol absoluto por 1 min e a diafanização com três banhos de xilol por 5 min. As lâminas foram montadas com lamínulas de vidro e Permount® (Fisher Scientific, Fair Lawn, CA, código SP15-500).

Foram consideradas imunopositivas as estruturas ou células coradas em marrom. Foram capturadas em média cinco imagens aleatórias de pontos representativos de toda a lesão, de cada lâmina, através de uma microcâmera Dinolite® AM 423X (AmMo Electronics Corporation, New Taipei city, Taiwan) acoplada ao microscópio Olympus BX-50 (Olympus, Tóquio, Japão) em magnificação de 400X. As imagens foram analisadas no programa de morfometria Image Pro-Plus 4.5, sendo obtida a área de MMP-1 em μm^2 .

Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o software SPSS versão 19.0. Visando comparar se os valores médios das variáveis analisadas (MMP-1 em 7, 14 e 21 dias, grupo treinado e sedentário) apresentavam diferença estatisticamente significativa segundo grupo. Testou-se inicialmente a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro Wilk, onde se observou que as variáveis apresentavam distribuição normal. Dessa forma, a comparação dos valores médios segundo grupo foi feita utilizando o teste paramétrico ANOVA. Visando testar se os tratamentos apresentavam homogeneidade de variâncias, foi realizado o teste de homogeneidade de variâncias de Levene, que revelou que as variáveis apresentavam variâncias heterogêneas, segundo os diferentes grupos. Dessa forma, quando o teste ANOVA acusou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, a comparação dois a dois visando identificar quais grupos diferiam entre si, foi feita utilizando o teste de comparações múltiplas de Games Howell para variâncias heterogêneas. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

RESULTADOS

Uma menor expressão de MMP-1 foi observada no grupo treinado aos 14 dias quando comparado ao grupo sedentário. Aos 21 dias, houve uma inversão da expressão

de MMP-1, demonstrando no grupo treinado uma maior imunomarcaco comparado com o sedentário (tabela 1).

Aos 7 dias não foi observada diferença significativa em nenhum dos grupos estudados.

Não foi analisada a expressão de MMP-1 no dia 2 devido a não alteraco do colágeno em trabalhos realizados anteriormente pelo mesmo grupo de pesquisa avaliando a proporção de colágeno tipo I e tipo III (dados não publicados)².

TABELA 1: Valores médios e desvio padrão da área de MMP-1 (micrometros quadrados) nos grupos sedentários e treinado, nos tempos 7, 14 e 21 dias .

Dias pós- ulceração	Sedentários (X±DP)	Treinados (X±DP)	Teste de Games-Howell (valor de p)
7	19983,00±8150,06	8113,32±2207,15	0,15
14	26735,02±10773,28	2434,42±1324,40	0,01*
21	7273,49±2304,86	14586,71±8601,10	0,05*

Teste ANOVA a dois critérios: p= 0,0003; X= média; DP= desvio padrão

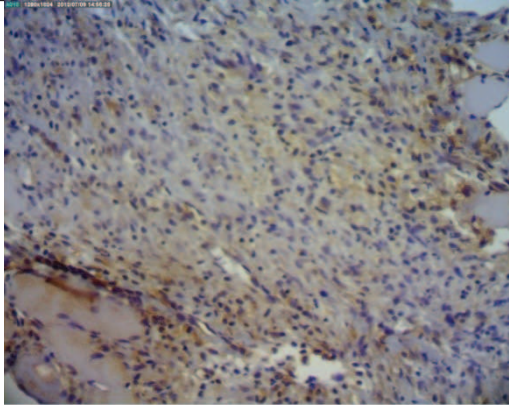
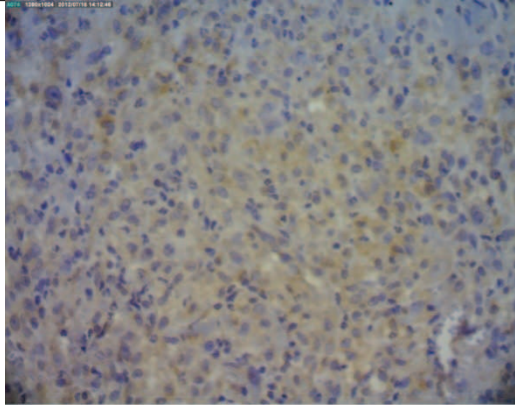
Na tabela 2 pode-se verificar que no grupo treinado houve um atraso na deposição do colágeno tipo I.

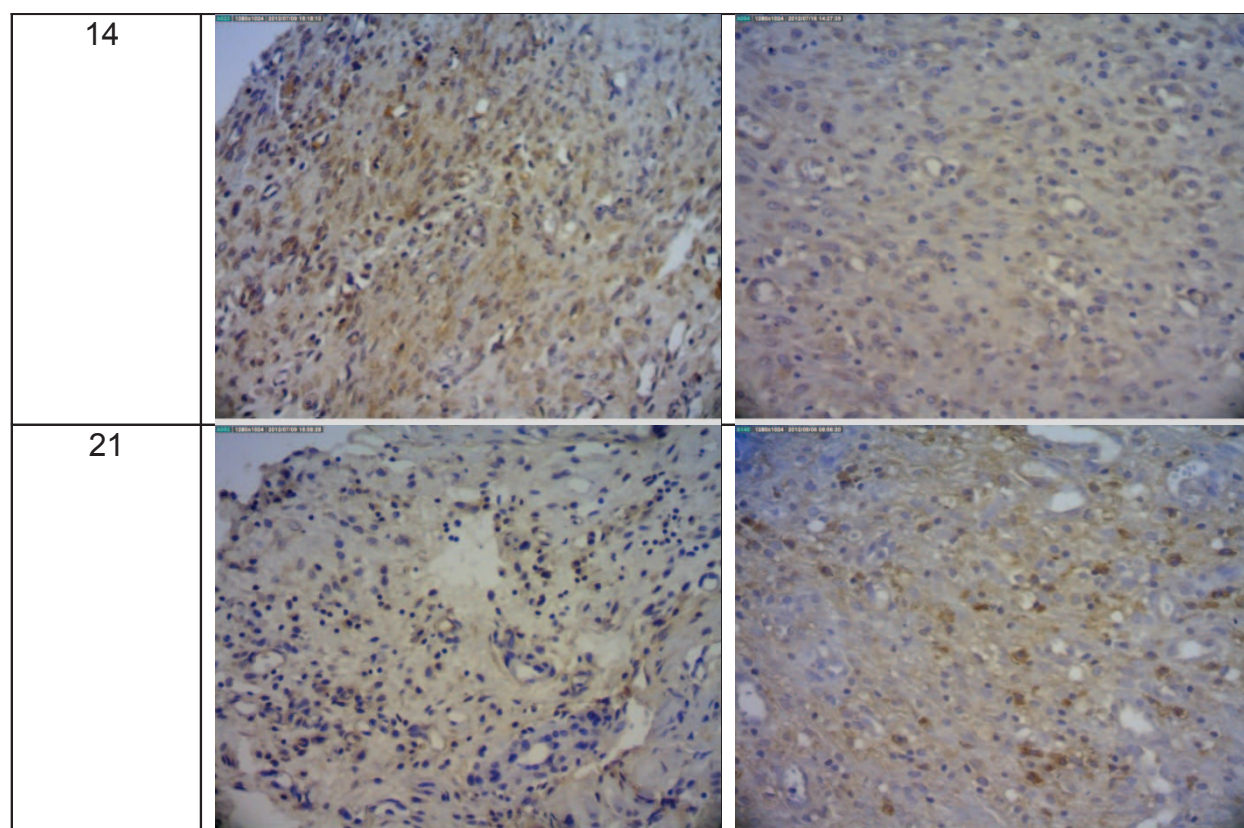
TABELA 2: Valores médios e desvio padrão da porcentagem da área de colágeno tipo III nos grupos sedentário e treinado, nos tempos 7, 14 e 21 dias³.

Dias pós-ulceração o	Sedentários (X±DP)	Treinados (X±DP)	Teste de Games-Howell (valor de p)
7	1,17±1,21	1,79±2,33	0,99
14	0,74±0,40	44,90±16,15	0,00*
21	1,02±0,94	13,19±9,09	0,02*

Teste ANOVA a dois critérios: p= 0,0003; X= média; DP= desvio padrão;

No quadro 1 podemos observar a maior expressão de MMP-1, em coloração marrom, no grupo sedentário aos 14 dias, e no grupo treinado aos 21 dias.

Tempo pós-ulceração (dias)	Sedentários	Treinados
7		



Quadro 1: Imunoexpressão da MMP-1 em coloração marrom, nos grupos sedentário e treinado aos 7, 14 e 21 dias após a ulceração. (aumento original de 400X).

DISCUSSÃO

Como demonstrado nos resultados, verificamos que uma menor expressão de MMP-1 no grupo treinado foi compatível com uma maior área de colágeno tipo III aos 14 dias, verificado no estudo prévio não publicado de Namba e Grégio (2009)⁴. Esse achado era esperado já que a MMP-1 degrada mais seletivamente o colágeno do tipo III (SAARIALHO-KERE, 1998) e, essa enzima, estando em menor quantidade, degradaria em menor proporção o colágeno III, o que levaria a uma maior área desse colágeno. Dos 14 aos 21 dias, foi observada uma redução considerável do colágeno tipo III, e isso é compatível com o aumento da MMP-1 expressa no grupo treinado nesse mesmo período de 21 dias. Possivelmente, se os animais fossem acompanhados por 28 dias, a quantidade de colágeno tipo III se equivaleria nos grupos sedentário e treinado. Estudos posteriores devem ser realizados para comprovar tal hipótese.

4

NAMBA, EL; GRÉGIO, AMT. **Efeito da atividade física sobre o processo de reparo de lesões do músculo gastrocnêmio de ratos**. 2009. 64, [2] f. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2009.

Em nosso estudo verificamos que, após a atividade física de seis semanas, a MMP-1 ficou reduzida aos 14 dias pós-ulceração, o que corrobora com os resultados obtidos por Li et al (2009), que avaliaram por PCR a MMP-1 em ratos submetidos a natação por 6 semanas. Mammi et al (2011) avaliaram a concentração sérica de MMP-1 em voluntários que realizaram exercício físico em cicloergômetro utilizando de 60 a 80% da frequência cardíaca máxima, por três semanas. Esses autores observaram que a MMP-1 também foi reduzida no grupo treinado.

Ao contrário desses estudos que avaliaram o exercício físico por um longo período, foi verificado que a expressão de MMP-1, avaliada imunohistoquimicamente em amostras de sangue, logo após uma única sessão de alta intensidade, aumentou (Urso et al., 2009). Cappelli et al (2009) também verificaram que a MMP-1 aumenta logo após uma única sessão de exercício físico de alta intensidade, retornando próximo aos níveis basais 24 horas após o exercício.

Uma hipótese para explicar essa diferença entre a avaliação do exercício a longo e a curto prazo esta fundamentada no aumento da MMP-1 no período inicial do exercício, e com o passar do tempo o organismo se adaptaria a atividade física constante, acarretando em uma diminuição da MMP-1.

É possível que a redução da MMP-1 em decorrência do exercício frequente esteja associada ao cálcio. Metaloproteinases são endopeptidases cálcio dependentes (CAPPELLI et al. 2009) e as fibras musculares necessitam de cálcio para que ocorra a interação entre actina e miosina durante a contração (FERREIRA, 2005). Dessa forma, cálcio poderia ser alvo de competição entre os dois locais, diminuindo a expressão de MMP-1.

Além desse mecanismo, outros fatores podem estar envolvidos com a prática da atividade física, e podem determinar situações metabólicas interdependentes que levem a liberação da MMP-1.

CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente trabalho, pode-se concluir que a atividade física frequente promoveu menor expressão da MMP-1, favorecendo a deposição de colágeno tipo III aos 14 dias e retardando o processo de reparo de feridas musculares aos 14 dias.

REFERÊNCIAS

- 1- Spinola AV, Manzzo IS, Rocha CM. As relações entre exercício físico e atividade física e o câncer. *ConScientiae Saúde*. 2007;6(1):29-48.
- 2- Chong-do Lee, Xumei S, Steven PH, James RH, Steven NB. Combined impact of lifestyle factors on cancer mortality in men. *Ann Epidemiol*. 2011;10(10):4.
- 3- Gleeson M, Burke L. Immune function in sport and exercise. *Journal of applied physiology*. 2007;103:693-699.
- 4- Field CJ, Johnson I, Pratt VC. Glutamine and arginine: immunonutrients for improved health. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2000;32(7):377-388.
- 5- Castell, L. Glutamine supplementation in vitro and in vivo, in exercise and immunodepression. *Sports Med*. 2003;33(5):323-345.
- 6- Pedersen, BK, Toft, AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Brasiliian Journal of Sports and Medicine*. 2000;34(10):246-251.
- 7- De Lima C, Alves LE, Lagher F, Machado AF, Bonatto SJ, Kuczera D, de Souza CF, Pequito DC, Muritiba AL, Nunes, EA, Fernandes LC. Anaerobic exercise reduces tumor growth, cancer cachexia, and increases macrophage and lymphocyte response in Walker 256 tumor-bearing rats. *Euro Journal of Applied Physiology*. 2008;104(6):957-964.
- 8- Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005;41(1):28-50.
- 9- MacLennan SV, Min D, Yue DK. Matrix metalloproteinases and their roles in poor wound healing in diabetes. *Wound practice and research*. 2008;16(3):116-121.
- 10- Pereira, Antonio L A; Veras, Simone S L; Silveira, J D; Freitas, Roseana A. O papel das proteínas de matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2005;71(1):81-86.
- 11- Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical – biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2007;15(6):2223-2268.
- 12- Warhonowicz M, Staszuk C, Gasse H. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinase-1 in the periodontal ligament of equine cheek teeth. *Tissue and Cell*. 2007;39(6):369-376.

- 13- Jucá M, Nunes BL, Menezes HL, Gomes EG, Matos D. Metaloproteinases 1 e 7 e Câncer Colorretal. *Ver. Brás. Coloproct.* 2008;28(3): 353-362.
- 14- Namba EL; Grégio, AMT. Efeito da atividade física sobre o processo de reparo de lesões do músculo gastrocnêmio de ratos. 2009. 64, [2] f. *Dissertação (Mestrado)* - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba.
- 15- Saarialho-Kere UK. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res.* 1998;290(1):47-54.
- 16- Li H, Zhang Y. Ma J. Effects of yiqi huoxue compound combined with exercise therapy on MMP-1 and collagen type III expression of cardiac muscle in chronic heart failure rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zi.* 2011;31(7):955-960.
- 17- Mammi C, Sala AL, Volterrani M, Gatta L, Antelmi A, Feraco A, Caminiti G, Marazzi G, Vitale C, Caprio M, Rosano GM. Exercise training reduces serum capacity to induce endothelial cell death in patients with chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure.* 2011;13(6):642-650.
- 18- Urso ML, Pierce JR, Alemany JA, Harman EA, Nindl BC. Effects of exercise training on the matrix metalloprotease response to acute exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2009;106(5):655-663.
- 19- Cappelli, J, Felicetti M, Capomaccio S, Pieramati C, Silvestrelli M, Verini-Supplizi A. Exercise-induce up-regulation of MMP-1 and IL-8 genes in endurance horses. *BMC Physiology.* 2009;6(12):1-6.
- 20- Ferreira TA. Fisiologia da contração muscular. *Revista neurociências.* 2005;15(3):60-62.
- 21- Imamura ST, Imamura M, Hirose-Pastor E. Efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre o colágeno do músculo esquelético humano. *Revista Bras Reumatol.* 1999;39(1)45-40.

TITLE PAGE

Expression of metalloproteinase-1 in Muscle Injury in Rats Subjected to Physical Activity.

YY Gama, AMT Grégio

Department of Biosciences, Graduate Program in Dentistry, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Mailing Address: Street Immaculate Conception, 1155 CEP 80215-901 - Curitiba - Paraná, Brazil - Phone: 41 3271-1637 - Fax: 41 3271-1405

Email: yesudianyamada@hotmail.com

Keywords: ulcer, metalloproteinase, collagen, physical activity.

ABSTRACT

MMP-1 is an enzyme whose function is degradation of collagen types I and III involved in wound repair. The present study aimed to verify the expression of MMP-1 in the process of wound repair opposite exercise. The ulcers were chemically induced in the gastrocnemius of rats submitted to swimming and sedentary rats. Was in the trained and sedentary, performed immunohistochemical assessment using anti-MMP-1. The trained group was submitted to swimming 5 times weekly for 60 minutes for 6 weeks. The trained animals showed decreased expression of MMP-1 after 14 days. On day 21 we observed a higher expression of MMP-1 in the trained group compared to the sedentary. It was concluded that physical activity can alter the expression of MMP-1, slowing the process of wound repair at 14 days.

SUMMARY

1

2

2.1

2.2 MATERIALS AND METHODS 8

2.2.1 Sample Selection 8

2.2.2 Physical Activity9

2.2.3 ulceration gastrocnemius11

2.2.4 Reaction immunohistochemistry and immunoblotting analysis 12

2.2.5 Statistical Analysis 13

2.3

2.4

3

4 ingles

Annex 5

THANKS

First I would like to thank my mother Elisabeth Yamada and my father Uberto Gama for always being by my side and for giving me the opportunity to study and choose the profession I always wanted, even though it would not be easy, they taught me that when we like what we do, we go far.

I want to thank my fiancée Ana Paula Andrade, who always supported me and encouraged me not to give up, which is always by my side every day, in good times and bad, without it we would arrive here.

I thank all the teachers who have crossed my path since Stella Maris school, high school and OPET Don Bosco College Don Bosco and expertise PUCPR. There are many names to put here, but all have their merits and never forget.

My guiding Ana Maria Trindade Gregio and Aline Cristina Rodrigues Johann Baptist, which led me throughout the masters, and even though I was in a different area of my training, I did write and led me to Congress, always with great patience and understanding during the entire route.

I can not forget the teacher Edvaldo Rosa, who also supported me since the beginning of the master, and gave important tips during the process, taught us writing articles and book chapters.

Finally there are many people who would like to thank, but I would be very long, so I want to thank all my friends, students and family.

Nothing in life is easy, but when we have a goal, you must have focus and go all the way!

Thank you!

ARTICLE

METALLOPROTEINASE-1 EXPRESSION IN MUSCLE INJURY IN RATS SUBMITTED TO SWIMMING

YESUDIAN YAMADA DA GAMA

Master Dentistry - Area of Concentration in Biosciences
Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil.
School of Health and Bioscience
Postgraduate Program in Dentistry
Email: yesudianyamada@hotmail.com

ANA MARIA TRINDADE GRÉGIO

Professor of the Graduate Program in Dentistry
Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil.
School of Health and Bioscience
Email: ana.gregio @ pucpr.br

Mailing address

Professor. Dr. Ana Maria Trindade Gregio
Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil.
School of Health and Bioscience
Program graduate in Dentistry-Concentration Area in Stomatology
Street Immaculate Conception, 1155, Bairro Prado Velho, CEP 80215-901 - Curitiba, PR.
Phone: 55 41 3271-1637 / 55 41 3271-1405 Fax
Email: ana.gregio @ pucpr.br

INTRODUCTION

For the repair process occurs, it is necessary first that the injured tissue is degraded. After this degradation, fibroblasts synthesize collagen type III. In a later stage, type III collagen is deposited replaced by collagen type I. This replacement begins at approximately 10 days. (BALBINO et al. 2,005). So much for the degradation of damaged tissue, and for the replacement of collagen degradation and is required for activation of some enzymes, metalloproteinases (MMP) (MCLENNAN, 2008).

There are about 20 MMP which are divided into five groups, namely: collagenases, stromelysins, gelatinases, MMPs matrilysins and linked to the plasma membrane (Pereira et al. 2005; MCLENNAN, 2008; VERMA, 2007).

MMP-1, an interstitial collagenase, is the most abundant and metalloproteinase is directly linked to the process of remodeling (Warhonowicz et al. 2007). When an injury occurs, the MMP-1 degrades interstitial collagen remaining type I (mature), paving the way for the formation of collagen III (immature) deposited by fibroblasts. The subsequent replacement of collagen I to III, which is stronger, it also occurs with the participation MMP-1. This MMP-I is synthesized by a variety of cell types, including epithelial cells, mesenchymal cells, inflammatory, neoplastic cells and fibroblasts (MCLENAN et al. 2,008; Dickie et al. 2,008).

Previous studies found changes in MMP-1 after physical exercise (Li et al, 2009), which verified by means of PCR reduction of MMP-1 in cardiac muscle of rats swimming. Mammi et al (2011) also found, by evaluating serum, reduction of MMP-1 in volunteers who performed exercise on a cycle ergometer. However, in short exercises, was found by blood collection using immunohistochemistry, increased expression of MMP-1 (BEAR et. Al 2009). Cappelli et al (2009) also verified by PCR on blood samples, an increase in gene expression of MMP-1 after a single session of high intensity exercise. However, no study has evaluated the expression of MMP-1 in ulcer rats subjected to physical training.

In a previous study (unpublished) was observed in rats with induced ulcers, increased expression of collagen type III at 14 days, comparing animals undergoing physical training in sedentary. Given this finding, the aim of this study was to analyze the expression of MMP-1, which is responsible for cleavage of collagen type I and III, as well as remodeling,

could have an influence on this higher expression of collagen type III at 14 days in animals undergoing physical training.

MATERIAL AND METHOD

This study was approved by the ethics committee on animal use of the Pontifical Catholic University of Paraná as seems: CEUA/PUCPR-297/07.

The sample consisted of blocks processed and archived in the laboratory of experimental pathology PUCPR previous study (unpublished) of Namba & Gregio (2009) 1. Therefore, we used 62 adult male Wistar rats were divided into two groups: group training with muscle injury (GT) and sedentary group with muscle injury (GS).

Physical Activity

Physical activity was chosen swimming, and initially for a week was held the adaptation of group trained to the aquatic environment, starting training with 20 min and 10 min added daily to the fifth day the animals were already swimming for 60 min. After the adjustment has been added to the training load equivalent to 5% of body weight attached to the thorax of the animal with adhesive tape. The training lasted for 60 min daily, often five days a week, with a total duration of six weeks. The training started at 8:00 am and was used a container of asbestos (100cm x 70cm x 60cm) with water 40cm column, to prevent the mice support the tail on the bottom of the container. The water temperature was maintained at 32 ± 1 ° C. After the end of the swimming sessions, the rats were downsized and taken to their cages in a room with a temperature of 25 ° C.

The control group was subjected to the aquatic environment only to simulate the conditions of the trained group, but were not trained.

Ulceration of the gastrocnemius

The ulceration in the gastrocnemius of animals was performed after the period of adaptation to physical activity. The ulcer was induced by subcutaneous injection of NaOH 40%. The animals were anaesthetized with thiopental (80mg/kg) prior to ulceration. The animals were killed by overdose of anesthetic solution (150mg/kg) on days 7, 14 and 21, so they completed the last training session.

Immunohistochemistry and immunoblotting analysis

Immunohistochemical reactions for protein labeling MMP-1 were performed in the Laboratory of Experimental Pathology PUCPR.

From paraffin blocks were obtained from histological sections of 4 mm thick which were extended on electrically charged slides (Green autoWrite ® Adhesion Slides Cut Edges, Sakura, CA, 9546-1 code). Slides were dried at 60 ° C for 24h. The deparaffinization was made with xylene at room temperature (two baths of 10 min). Then, sections were hydrated in absolute ethanol (three baths 1 min) and ethanol 80% (1 1min bath). To inhibit endogenous peroxidase, the sections were incubated in a solution of hydrogen peroxide and 5% methanol and rinsed in distilled water. Then, we performed antigen retrieval, where the slides were immersed in stove Immuno Retrifer (Dako, Carpinteria, CA) in a water bath at 99 ° C for 30 min, left to cool to room temperature and then washed in distilled water. Then the slides were stained with a Dako pen Pen (Dako, Carpinteria, CA, Code S2002), delimiting the area of the cut.

The sections were stored in TBS-Tris buffer (pH 7.3) until the time of incubation with the primary antibody. The sections were dried and incubated with the primary antibody anti-MMP-1 rabbit monoclonal, clone: EP247Y (Millipore, CA) in a humidified chamber at 4 ° C, "overnight". The dilution of the antibody in Antibody Diluent with Background-Reducing Components (DAKO Carpinteria, CA code S302283) was 1:50. The positive control used was the placenta. The negative control was obtained by omitting the primary antibody. After incubation, sections were incubated in TBS-Tris buffer (pH 7.3) and kept in the buffer for 15 min. Then the sections were washed again with buffer, the slides were dried and incubated with Advance link (Dako, Carpinteria, CA, code K406889) for 30 min at room temperature and humidity chamber. Slides were washed with TBS-Tris buffer (pH 7.3), and then dried and incubated in Advance enzyme (Dako Corporation, Carpinteria, CA code K406889) for 30 min at room temperature and humidity chamber. Then, the sections were washed in TBS-buffer Tris (pH 7.3). Disclosure of the reaction solution was run with the chromogen 3,3'-diaminobenzidine (1:1) (DAB - Sigma Chemical, St. Louis, MO, code D7679) for 5 min. This was followed by washing in distilled water baths. Counter-staining was made with Harris hematoxylin solution for 5 min. Then, the slides were washed in running water, and kept in water for 5 min. This was followed by dehydration in three baths of absolute ethanol for 1 min and cleared with three changes of xylene for 5 min. The slides were mounted with glass coverslips and Permount ® (Fisher Scientific, Fair Lawn, CA, code SP15-500).

Were considered immunopositive structures or cells stained brown. There were an average of five images captured aleartórias of representative points throughout the lesion of each blade through a micro AM Dino-Lite ® 423X (amino Electronics Corporation, New Taipei City, Taiwan) coupled to an Olympus BX-50 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) at a magnification of 400X. The images were analyzed in morphometry program Image-Pro Plus 4.5, and obtained the area of MMP-1 in nm ².

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 19.0. To compare the mean values of the variables (MMP-1-1 in 7, 14 and 21 days, trained and sedentary group) had statistically significant second group. Was initially tested the data for normality using the Shapiro Wilk, where it was observed that the variables had a normal distribution. Thus, the comparison of the mean values second group was made using ANOVA. To test whether the treatments had homogeneity of variance was performed to test for homogeneity of variances Levene, who revealed that the variables had heterogeneous variances, according to the different groups. Thus, when the ANOVA accused statistically significant difference between groups, pairwise comparison to identify which groups differed from each other, was made using the multiple comparison test of Games Howell for heterogeneous variances. The level of significance for all tests was 5%.

RESULTS

A lower expression of MMP-1 was observed in the trained group at 14 days when compared to the sedentary group. At 21 days, there was a reversal of MMP-1 expression, demonstrating greater in the trained compared to sedentary immunostaining (Table 1).

At 7 days there was no significant difference in any of the groups studied.

There was analyzed the expression of MMP-1 on day 2 due to no change in collagen on previous work by the same research group evaluating the ratio of collagen type I and type III (unpublished data).

TABLE 1: Mean and standard deviation of the area of MMP-1 (square micrometers) in sedentary and trained at Times 7, 14 and 21 days.

Dias pós-ulceração o	Sedentários (X±DP)	Treinados (X±DP)	Teste de Games-Howell (valor de p)
7	19983,00±8150,06	8113,32±2207,15	0,15
14	26735,02±10773,28	2434,42±1324,40	0,01*
21	7273,49±2304,86	14586,71±8601,10	0,05*

In Table 2 it can be seen that the trained group there was a delay in the deposition of collagen type I.

TABLE 2: Mean and standard deviation of the percentage area of collagen type III in sedentary and trained groups at Times 7, 14 and 21 days.

Dias pós-ulceração o	Sedentários (X±DP)	Treinados (X±DP)	Teste de Games-Howell (valor de p)
7	1,17±1,21	1,79±2,33	0,99
14	0,74±0,40	44,90±16,15	0,00*
21	1,02±0,94	13,19±9,09	0,02*

In Figure 1 we can observe the increased expression of MMP-1 in brown color, in the sedentary group at 14 days, and in the trained group at 21 days.

Tempo pós-ulceração (dias)	Sedentários	Treinados

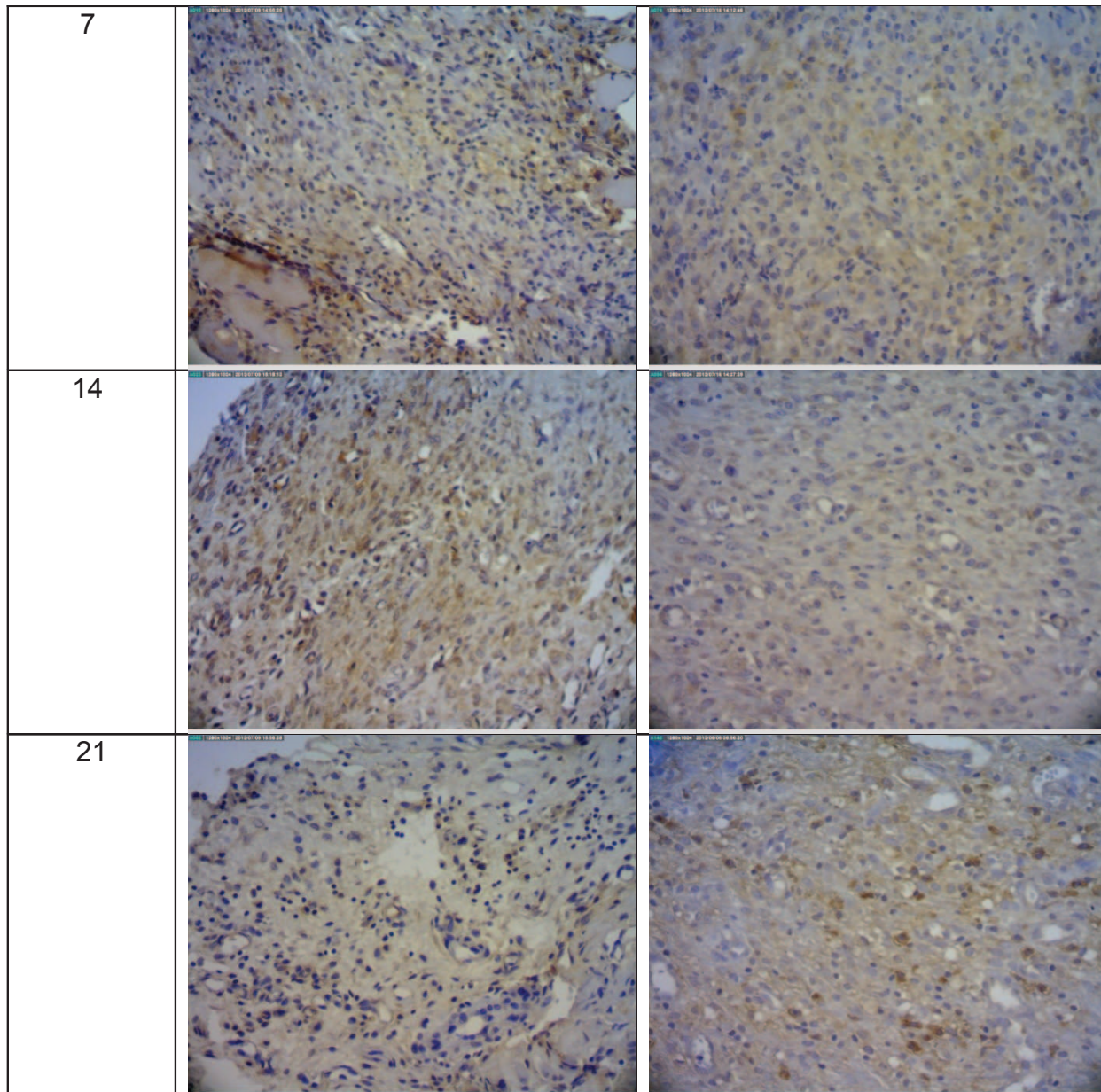


Figure 1: immunoexpression of MMP-1 in brown color, in sedentary and trained groups at 7, 14 and 21 days after ulceration. (original magnification 400X).

DISCUSSION

As shown in the results, we found that a lower expression of MMP-1 in the trained group was compatible with a larger area of collagen type III at 14 days, occurred in the previous study unpublished Gregio and Namba (2009). This finding was expected since the MMP-1 more selectively degrades collagen type III (Saarialho-Kere, 1998), and this enzyme, with a lesser amount, to a lesser extent degrade collagen III, which would lead to a larger area this collagen. From 14 to 21 days, there was a considerable reduction of collagen type III,

and this is consistent with the increase in MMP-1 expressed in the trained group during the same period of 21 days. Possibly, if animals were monitored for 28 days, the amount of collagen type III is equivalent in sedentary and trained groups. Further studies should be conducted to confirm this hypothesis.

In our study we found that, after six weeks of physical activity, MMP-1 was reduced to 14 days after ulceration, which agrees with the results obtained by Li et al (2009), who assessed by PCR MMP-1 in rats subjected to swimming for 6 weeks. Mammi et al (2011) evaluated the serum concentration of MMP-1 in volunteers who performed exercise on a cycle ergometer using 60-80% of maximum heart rate, for three weeks. These authors observed that MMP-1 was also reduced in the trained group.

Unlike these studies evaluated the physical exercise for a long period, it was observed that the expression of MMP-1, evaluated immunohistochemically in blood samples after one session of high intensity increased (Bear et al. 2009). Cappelli et al (2009) also found that MMP-1 increases after a single session of high-intensity exercise, returning to near baseline levels 24 hours after exercise.

One hypothesis to explain this difference between the assessment exercise in the long and short term grounded in the increase of MMP-1 in the initial period of the year, and over time the body adapt to constant physical activity, resulting in a decreased MMP-1.

It is possible that the decrease in MMP-1 due to the frequent exercise is associated with calcium. Metalloproteinases are endopeptidases dependent calcium (CAPPELLI et al. 2009) and the muscle fibers require calcium for the occurrence of interaction between actin and myosin during contraction (FERREIRA, 2005). Thus, calcium may be subject to competition between the two locations, decreasing the expression of MMP-1.

In addition to this mechanism, other factors may be involved in physical activity, and can determine metabolic interdependent situations that lead to release of MMP-1.

CONCLUSION

Within the limits of this study, it can be concluded that physical activity promoted less frequent expression of MMP-1, favoring the deposition of collagen type III at 14 days and slowing the process of wound repair muscle at 14 days.

REFERENCES

- 1- Spinola AV, Manzzo IS, Rocha CM. As relações entre exercício físico e atividade física e o câncer. *ConScientiae Saúde*. 2007;6(1):29-48.
- 2- Chong-do Lee, Xumei S, Steven PH, James RH, Steven NB. Combined impact of lifestyle factors on cancer mortality in men. *Ann Epidemiol*. 2011;10(10):4.
- 3- Gleeson M, Burke L. Immune function in sport and exercise. *Journal of applied physiology*. 2007;103:693-699.
- 4- Field CJ, Johnson I, Pratt VC. Glutamine and arginine: immunonutrients for improved health. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2000;32(7):377-388.
- 5- Castell, L. Glutamine supplementation in vitro and in vivo, in exercise and immunodepression. *Sports Med*. 2003;33(5):323-345.
- 6- Pedersen, BK, Toft, AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Brasiliian Journal of Sports and Medicine*. 2000;34(10):246-251.
- 7- De Lima C, Alves LE, Lagher F, Machado AF, Bonatto SJ, Kuczera D, de Souza CF, Pequeto DC, Muritiba AL, Nunes, EA, Fernandes LC. Anaerobic exercise reduces tumor growth, cancer cachexia, and increases macrophage and lymphocyte response in Walker 256 tumor-bearing rats. *Euro Journal of Applied Physiology*. 2008;104(6):957-964.
- 8- Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005;41(1):28-50.
- 9- MacLennan SV, Min D, Yue DK. Matrix metalloproteinases and their roles in poor wound healing in diabetes. *Wound practice and research*. 2008;16(3):116-121.
- 10- Pereira, Antonio L A; Veras, Simone S L; Silveira, J D; Freitas, Roseana A. O papel das proteínas de matriz extracelular e das metaloproteínases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2005;71(1):81-86.
- 11- Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical – biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2007;15(6):2223-2268.

- 12- Warhonowicz M, Staszyk C, Gasse H. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinase-1 in the periodontal ligament of equine cheek teeth. *Tissue and Cell*. 2007;39(6):369-376.
- 13- Jucá M, Nunes BL, Menezes HL, Gomes EG, Matos D. Metaloproteinases 1 e 7 e Câncer Colorretal. *Ver. Brás. Coloproct*. 2008;28(3): 353-362.
- 14- Namba EL; Grégio, AMT. Efeito da atividade física sobre o processo de reparo de lesões do músculo gastrocnêmio de ratos. 2009. 64, [2] f. *Dissertação (Mestrado)* - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba.
- 15- Saarialho-Kere UK. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res*. 1998;290(1):47-54.
- 16- Li H, Zhang Y. Ma J. Effects of yiqi huoxue compound combined with exercise therapy on MMP-1 and collagen type III expression of cardiac muscle in chronic heart failure rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zi*. 2011;31(7):955-960.
- 17- Mammi C, Sala AL, Volterrani M, Gatta L, Antelmi A, Feraco A, Caminiti G, Marazzi G, Vitale C, Caprio M, Rosano GM. Exercise training reduces serum capacity to induce endothelial cell death in patients with chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure*. 2011;13(6):642-650.
- 18- Urso ML, Pierce JR, Alemany JA, Harman EA, Nindl BC. Effects of exercise training on the matrix metalloprotease response to acute exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2009;106(5):655-663.
- 19- Cappelli, J, Felicetti M, Capomaccio S, Pieramati C, Silvestrelli M, Verini-Supplizi A. Exercise-induce up-regulation of MMP-1 and IL-8 genes in endurance horses. *BMC Physiology*. 2009;6(12):1-6.
- 20- Ferreira TA. Fisiologia da contração muscular. *Revista neurociências*. 2005;15(3):60-62.
- 21- Imamura ST, Imamura M, Hirose-Pastor E. Efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre o colágeno do músculo esquelético humano. *Revista Bras Reumatol*. 1999;39(1)45-40.