

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

ELI LUIS NAMBA

**EFEITO DA ATIVIDADE FÍSICA SOBRE O PROCESSO DE REPARO DE LESÕES
DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATOS**

CURITIBA

2009

ELI LUIS NAMBA

**EFEITO DA ATIVIDADE FÍSICA SOBRE O PROCESSO DE REPARO DE LESÕES
DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Odontologia. Área de concentração: Estomatologia.

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

CURITIBA

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus e a Nossa Senhora do Perpétuo Socorro pela luz e pelo caminho apresentado para o desenvolvimento deste trabalho, agradeço também as dificuldades impostas, as vitórias concebidas e aos frutos que geraram um grande crescimento espiritual.

Aos meus pais, Katsumi Namba e Ludvina S. Namba pelo apoio incondicional e a toda minha família pelo exemplo e força.

Faço um agradecimento especial a minha esposa Camila M. Namba, que em todos os momentos esteve ao meu lado. Principalmente nos momentos difíceis que não foram poucos, aproveito o espaço para dedicar esta conquista a ela e dizer que a AMO MUITO.

Aos alunos e amigos: Thiago Nawcki, Rodrigo Valentim, Mariele Thomé Jung e Camila Fortkamp pois sem a ajuda de vocês este projeto não teria saído do papel e os seus esforços e suor literalmente fazem parte de minha conquista que se estende a todos vocês.

Agradeço a todos os funcionários e professores que de maneira direta ou indireta ajudaram no desenvolvimento desta pesquisa em especial ao professor Dr. Antônio Adilson Soares de Lima, professora Dra Maria Ângela Naval Machado e a professora Dra Luciana Reis de Azevedo Alanis.

A professora Dra Ana Maria Trindade Grégio agradeço não apenas a orientação, mas aos conselhos, dedicação e principalmente o fato de aceitar o desafio de construir um trabalho em uma nova área de atuação e que com grande maestria soube transpassar os obstáculos colocados em nossos caminhos.

“Há os que se queixam do vento. Os que esperam que ele mude. E os que procuram ajustar as velas”. (William G. Ward)

PÁGINA TÍTULO

Efeito da atividade física sobre o processo de reparo de lesões do músculo gastrocnêmio de ratos

EL Namba¹, AMT Grégio²

Curso de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

1 Aluno do mestrado em Odontologia área de concentração em Estomatologia

2 Departamento de Odontologia

Autor para correspondência, Rua Imaculada Conceição, 1155 / 80.215-901 – Curitiba-PR – Brasil / Fone: 55 41 3271-1637 / Fax: 55 41 3271-1405 / email: ana.gregio@pucpr.br

Palavras-chave: Inflamação. Processo de reparo. Exercício físico. Lesão muscular.

Número de palavras no resumo: 228

Número de palavras no resumo e texto: 3956

Número de tabelas e figuras: 49

Número de referências bibliográficas: 21

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do exercício físico no processo inflamatório e no reparo de lesão muscular. Foram utilizados 62 ratos machos da linhagem Wistar com idade aproximada de 45 a 50 dias. Os animais foram aleatoriamente divididos, o grupo experimental (G1) que caracterizou-se pela associação da atividade física e a lesão muscular e o grupo controle (G2) por animais sedentários com a presença da lesão muscular. A atividade física de escolha foi a natação, onde os animais realizaram um treinamento padronizado. Em ambos os grupos as lesões no músculo gastrocnêmio foram induzidas pela aplicação de NaOH a 40% por via subcutânea. Após a lesão instalada os animais foram sacrificados no período de 2, 7, 14 e 21 dias. As lesões foram removidas e avaliadas histologicamente pela coloração de hematoxilina e eosina (HE) e Picrosirius (SR) sob luz polarizada por um programa de computador (Image Pro Plus). A análise estatística utilizada foi o teste T de Student para as variáveis independentes do tempo e Games-Howell para as variáveis grupo e tempo. Os resultados demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) na deposição de colágeno imaturo nos períodos de 14 ($p = 0,000$) e 21 dias ($p = 0,029$) e uma maior deposição de colágeno jovem no grupo experimental. Concluiu-se que a atividade física promoveu um aumento da deposição de colágeno imaturo no processo de reparo de lesões musculares.

Palavras-chave: Inflamação; Processo de reparo; Exercício físico; Lesão muscular.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of exercise in the repair of a muscle injury. We used 62 male rats of Wistar with aged approximately 45 to 50 days. The animals were divided into 2 groups. The experimental group (G1) was characterized by the association of physical activity and muscle damage and the control group (G2) had sedentary animals with muscle damage. The physical activity of choice was swimming, by which the animals performed a standardized training. In both groups the lesions in the gastrocnemius muscle were installed by the application sub-cutaneous of NaOH on percentage of 40%. After the injury was installed the animals were sacrificed in the period of 2, 7, 14 and 21 days. The lesions were removed and evaluated qualitatively on HE and staining of Red Picrossirius through a computer program (Image Pro Plus). The statistical analysis used was Student's t test for independent variables of time and Games-Howell for the variables group and time. The results showed significant difference ($p < 0.05$) in the deposition of immature collagen in the periods of 14 ($p = 0.000$) and 21 days ($p = 0.029$) and increased deposition of immature collagen in the experimental group. Concluded that physical activity promotes an increase in deposition of immature collagen in the repair of muscle injury.

Keywords: Inflammation; Repair process; Exercise; Muscle injury.

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS	6
TÍTULO DO ARTIGO	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAIS E MÉTODOS	10
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	18
CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	23
ARTIGO EM INGLÊS	26
TITLE OF THE MANUSCRIPT	27
INTRODUCTION	28
MATERIALS AND METHODS	30
RESULTS	33
DISCUSSION	38
CONCLUSION	41
REFERENCES	42
ANEXO A	45
ANEXO B	51
ANEXO C	56
ANEXO D	64

ARTIGO EM PORTUGUÊS

**EFEITO DA ATIVIDADE FÍSICA SOBRE O PROCESSO DE REPARO DE LESÕES
DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATOS**

INTRODUÇÃO

Uma população que realiza algum tipo de atividade física moderada tem como resultado um menor número de enfermidades, um menor risco de desenvolver câncer e infecções, maior empenho nas atividades escolares e do trabalho e menor utilização de recursos da assistência de saúde. Num contexto geral, os exercícios físicos exercem importante papel na qualidade de vida. A literatura confirma um efeito benéfico da atividade física sobre o alívio dos sintomas de depressão e ansiedade, o aprimoramento do estado de humor e da qualidade de vida.⁴

Atualmente, os mecanismos pelos quais os exercícios ajudam a reduzir a suscetibilidade às infecções não são bem conhecidos. Uma hipótese afirma que os exercícios físicos criam um ambiente hostil aos microorganismos invasores. Um exemplo deste fato é a elevação na temperatura corporal que acompanha o exercício físico. Outra hipótese defende que o exercício propicia um equilíbrio mais favorável entre o sistema imune, a resposta orgânica ao estresse e a liberação de neurohormônios (cortisol e adrenalina). Além disso, também ocorrem alterações favoráveis nos componentes do próprio sistema imunológico.⁴

A atividade física regular realizada simultaneamente a um processo inflamatório atenua sua resposta e, desta forma, interfere na recuperação tecidual.⁷

Durante a atividade física, pode-se observar alterações de algumas células envolvidas no processo inflamatório. Com relação aos exercícios de alta intensidade, é possível se observar um aumento no número de leucócitos, estas células podem aumentar em cerca de 50 a 100% após a atividade física. Esse incremento da atividade leucocitária é menor após um período de repouso de 30 minutos, devido à reposição do sistema fisiológico.^{18,10}

Outros tipos celulares também sofrem alterações, os macrófagos, parecem ser estimulados durante o estresse físico e suas funções são potencializadas com um aumento no processo de fagocitose.¹⁸

O músculo é um tecido com propriedade de adaptação a estímulos fisiológicos e patológicos e que apresenta um alto grau de remodelamento frente a diversos estímulos. Ele também é frequentemente afetado por traumatismos da vida diária e pelas atividades esportivas. Assim, a rápida recuperação deste tecido com manutenção de suas propriedades mecânicas é importante para o indivíduo.¹¹

O processo de reparo apresenta diferentes estágios de formação tecidual após injúria. As fases da inflamação iniciam-se logo após o dano tecidual e os componentes celulares do sistema imune passam a interagir com a área lesionada contribuindo desta forma na reparação tecidual, pela produção de moléculas pró-inflamatórias e da síntese da matriz celular.¹²

Neste sentido, a proposta desta pesquisa foi averiguar a resposta inflamatória frente ao estado de treinamento e o processo de reparo de lesões musculares, entre animais treinados e sedentários, por meio de uma avaliação histológica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização deste estudo o projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA/PUCPR – 297/07). Para tanto foram utilizados 62 ratos machos da linhagem Wistar com idade aproximada de 45 a 50 dias e peso médio de 250g. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum* e respeitou-se o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro para evitar alterações no ciclo metabólico.¹⁹ Os animais foram divididos em 2 grupos: a) Grupo experimental (G1): 34 animais portadores de lesão muscular e que praticavam atividade física e b) Grupo controle (G2): 28 animais sedentários portadores de lesão muscular. Dentro de cada grupo os animais foram subdivididos em 4 subgrupos para a avaliação do processo de reparo após a instalação da lesão muscular. Os períodos de análise foram respectivamente: 2, 7, 14 e 21 dias após indução da lesão muscular. Cada subgrupo continha 7 animais com exceção do G1 nos períodos de 14 e 21 dias que apresentavam 10 animais. O processo de reparo foi avaliado sem nenhuma interferência terapêutica, sendo assistido somente pela ação natural do organismo.

Os animais do grupo experimental (G1) realizaram como treinamento a natação por 33 dias de acordo com a metodologia descrita por Gonçalves, (1999), respeitando os períodos de eutanásia de cada subgrupo (2, 7, 14 e 21), sendo 5 dias de treino e 2 dias de repouso.

Na primeira semana, realizou-se a adaptação dos animais ao ambiente aquático, iniciando o treinamento com 10 minutos, crescendo 10 minutos diários para que ao quinto dia os animais já estivessem nadando por 50 minutos. Na segunda semana, após a adaptação, acrescentou-se ao treinamento uma carga equivalente a 5% do peso corporal acoplada ao tórax. Esta carga foi acrescentada diariamente após pesagem do animal colando-se o peso equivalente ao tórax, utilizando um elástico.⁷

Na terceira semana, no 12º dia de treinamento realizou-se a lesão no músculo gastrocnêmio dos animais e mesmo após o início de formação da lesão os animais continuaram o treinamento. Após 2, 7, 14 e 21 dias da indução da lesão muscular os animais do G1 foram sacrificados. As sessões de natação iniciaram às 8 horas em recipiente de amianto (100cm x 70cm x 60cm) com coluna de água de 40cm, para evitar que os ratos apoiassem a cauda no fundo do recipiente. A temperatura da

água apresentou uma variação de 32°C a 25°C. Após o término das sessões de natação, os ratos eram enxugados e retornados às suas respectivas gaiolas em sala com temperatura de 25°C.⁷

Os animais do grupo controle (G2), apesar de não submetidos à natação, foram colocados na água nas mesmas condições anteriores por aproximadamente 2 minutos por dia a fim de simular o estímulo neurofisiológico causado no grupo experimental, para que não houvesse esta variação sobre as respostas do processo de reparo e sistema nervoso simpático.⁵

As lesões no músculo gastrocnêmio das patas direita dos ratos foram induzidas na terceira semana no 12º dia, pela aplicação de 0,08 mL de hidróxido de sódio a 40% pela via subcutânea.¹⁶ Para realização da lesão, os animais foram previamente anestesiados por meio de uma injeção intraperitoneal de tiopental sódico® 80mg/kg (Cristália, Brasil). Para ambos os grupos, as lesões foram realizadas na terceira semana após o início do experimento. Ao término do período experimental, os animais foram eutanasiados por overdose de solução anestésica (tiopental sódico, 150 mg/Kg).

Para avaliação histológica, segmentos teciduais abrangendo a área lesionada foram removidos cirurgicamente (músculo gastrocnêmio da pata do rato) e depois fixados em formalina neutra a 10% por 24 horas. Os espécimes teciduais foram desidratados, diafanizados e emblocados em parafina. Cortes histológicos com 5 µm de espessura foram corados pelas técnicas da hematoxilina-eosina (HE) e Picrosirius (SR) para avaliação do processo de reparo. O estudo histológico das lâminas coradas com HE foi do tipo cego, conduzido por um avaliador, devidamente calibrado. Os parâmetros avaliados foram as células envolvidas no processo inflamatório mostrando a ausência ou presença de infiltrado inflamatório agudo, crônico ou misto, foram avaliados sob microscopia de luz com um aumento original de 400X. As lâminas coradas por Picrosirius foram analisadas em relação ao percentual de colágeno sob microscopia de luz polarizada com aumento original de 200X. O colágeno maduro apresenta birrefringência intensa, apresentando coloração entre amarelo e vermelho, enquanto o colágeno imaturo produz coloração esverdeada sob microscopia de luz polarizada.⁶ A análise do percentual de colágeno foi realizada por meio do *software* 4.5 Image Pro-Plus® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), que calculou a porcentagem de colágeno maduro e imaturo. Foram analisados dois campos para cada corte histológico.

Na análise estatística, para testar o pressuposto de normalidade das variáveis para cada grupo utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste de Levene verificou a homogeneidade de variâncias entre os grupos. Para as amostras independentes para a variável grupo utilizou-se o teste t de Student. Na comparação entre as variáveis grupo e tempo utilizou ANOVA seguido do teste paramétrico de Games-Howell para as variâncias heterogêneas.

RESULTADOS

O exame macroscópico revelou uma hipertrofia muscular e uma menor quantidade de gordura nas proximidades do músculo gastrocnêmio onde foi induzida a lesão no grupo experimental quando comparado ao grupo controle.

Quanto ao tempo de morte os animais do G1 apresentaram uma maior resistência à ação do anestésico se comparado aos G2, sendo necessária uma complementação anestésica perfazendo o dobro da dose usual.

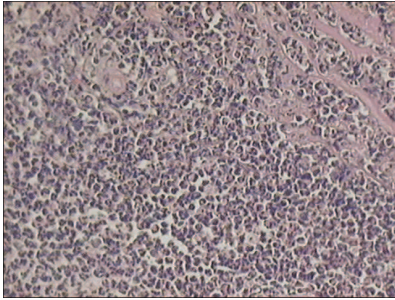
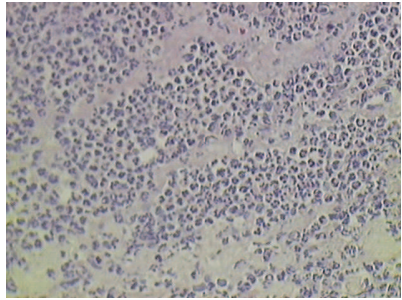
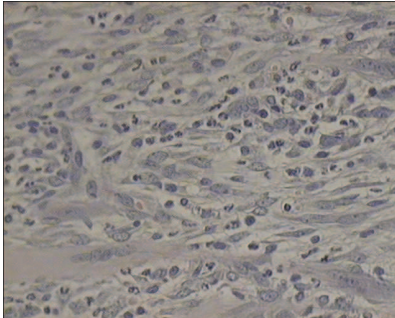
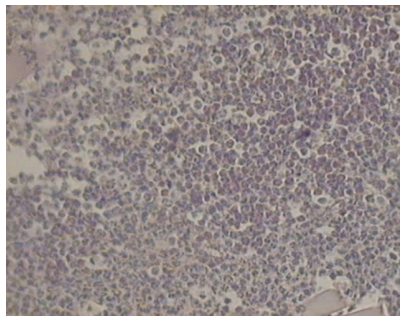
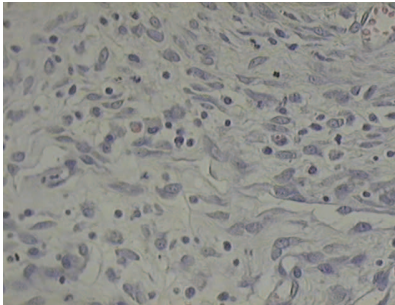
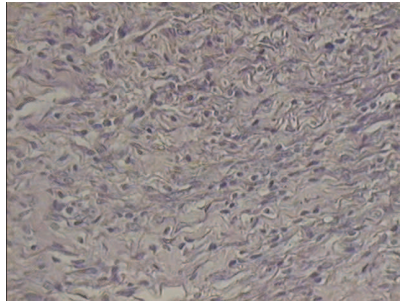
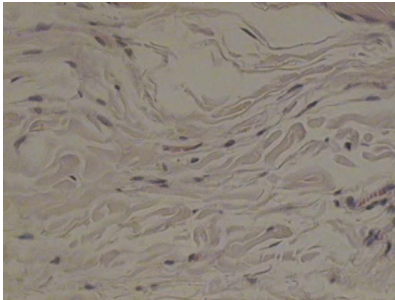
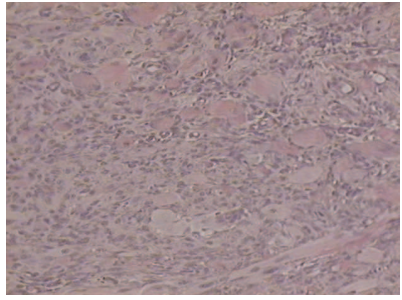
O estudo histológico demonstrou aspectos celulares característicos entre os diferentes grupos do experimento no decorrer dos períodos analisados.

No período de 2 dias, o grupo experimental apresentou um intenso infiltrado inflamatório agudo com grande número de células polimorfonucleares (neutrófilos) e poucas células mononucleares (macrófagos). A mesma reação tecidual procedeu no grupo controle, porém, o infiltrado inflamatório era de menor intensidade. Ainda observou-se em ambos os grupos entre as células mononucleares, possivelmente a presença de linfócitos. (Quadro 1 – Fig. A, E)

Aos 7 dias, ambos os grupos apresentaram um infiltrado inflamatório misto (Quadro 1 – Fig. B, F). O grupo experimental apresentou um menor número de células inflamatórias mononucleares e a presença de fibroblastos foi verificada. No 14º dia, o infiltrado inflamatório crônico foi de menor intensidade e foram observadas áreas onde as células mononucleares estavam dispersas no tecido muscular lesionado. Além disso, parecia existir um maior número de fibroblastos no local. (Quadro 1 – Fig. C, G)

Aos 21 dias o G1 apresentou pequena quantidade de células inflamatórias com exceção de fibroblastos. No G2 ainda havia presença de células inflamatórias mononucleares, possivelmente de macrófagos, porém em menor quantidade. (Quadro 1 – Fig. D, H)

Em todos os grupos a presença de novos vasos foi visível, entretanto nos animais do grupo experimental sua formação foi maior.

Tempo	G1		G2	
2 dias	A			E
7 dias	B			F
14 dias	C			G
21 dias	D			H

Quadro 1: Fotomicrografia da área do músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos G1 e G2 nos períodos de 2, 7, 14 e 21 dias (aumento original de 400X, HE). Demonstrando a evolução do processo inflamatório.

ANÁLISE QUANTITATIVA

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO COLÁGENO

Quando se comparou o tipo de colágeno formado entre grupos independentes da variável tempo, a quantidade de colágeno maduro (vermelho) foi predominantemente maior no grupo controle. Enquanto que no grupo experimental houve maior deposição de colágeno imaturo (verde). Uma vez que $p < 0,05$ existiu diferença estatística significativa na porcentagem média de colágeno maduro e imaturo entre os grupos (Tabela 1).

TABELA 1 –VALORES MÉDIOS DA PORCENTAGEM DE COLÁGENO MADURO E IMATURO

Porcentagem da Área de Colágeno	GRUPOS		
	EXPERIMENTAL (G1)	CONTROLE (G2)	p
Colágeno Maduro (Vermelho)	82,54 ± 21,09	98,85 ± 1,13	< 0,000 *
Colágeno Imaturo (Verde)	17,46 ± 21,09	1,15 ± 1,13	< 0,000 *

FONTE: Dados da pesquisa, PUCPR, 2009.

NOTA: * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Ao se comparar os grupos de animais com a variável tempo obteve-se os seguintes resultados: o grupo controle não apresentou diferença significativa na presença de colágeno maduro (vermelho) nos períodos de 2 e 7 dias (Quadro 2 – Fig. I, M, J, N) se comparado ao grupo experimental. Com relação aos períodos de 14 e 21 dias (Quadro 2 – Fig. K, O, L, P), a diferença do colágeno maduro foi significativa ($p < 0,05$), sendo que o grupo experimental apresentou uma quantidade menor deste tipo de colágeno (Tabela 2). Não foi observado diferença estatística no percentual de colágeno imaturo (verde) entre os períodos de 2 e 7 dias (Quadro 2 – Fig. I, M, J, N). Por outro lado, houve diferença estatística para a variável nos períodos de 14 e 21 dias ($p < 0,05$) (Quadro 2 – Fig. K, O, L, P). No G1, a deposição de colágeno imaturo foi maior quando comparado ao G2 (Tabela 3).

TABELA 2 –VALORES DE PORCENTAGEM DE COLÁGENO MATURO DE ACORDO COM A VARIÁVEL TEMPO.

Tipo de colágeno	Tempo	Experimental (G1)		Controle (G2)		p
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
Colágeno Maturo (Vermelho)	2	98,98	0,04	98,34	1,66	< 0,299
	7	98,21	2,33	98,83	1,21	< 0,997
	14	55,10	16,15	99,26	0,40	< 0,000*
	21	86,81	9,09	98,98	0,94	< 0,029*

FONTE: Dados da pesquisa, PUCPR, 2009.

NOTA: * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

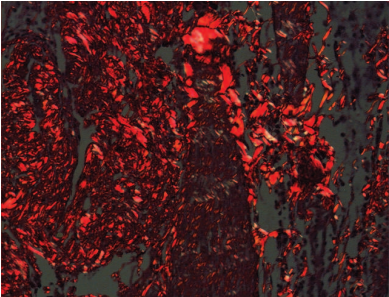
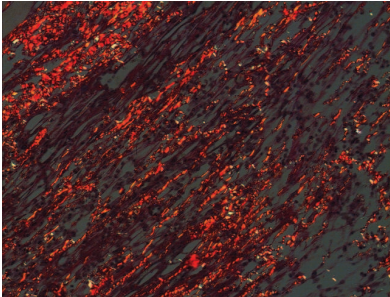
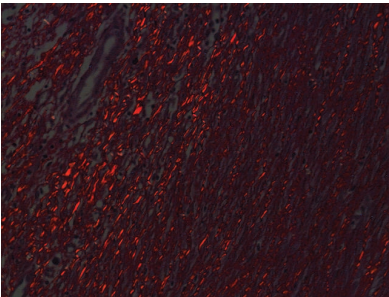
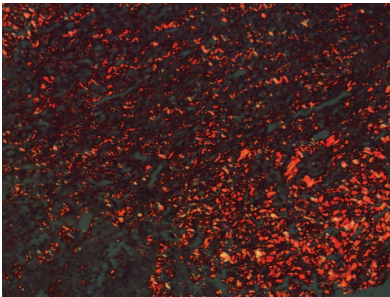
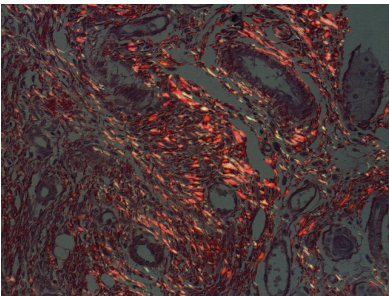
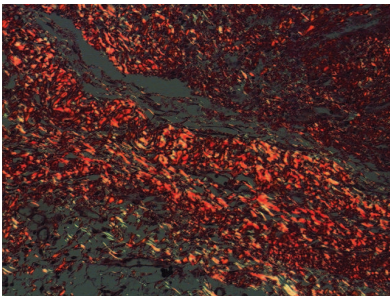
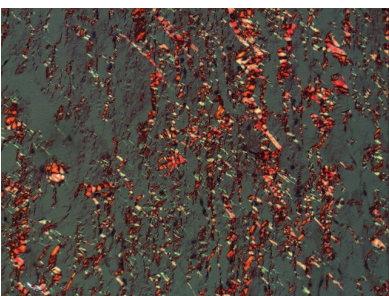
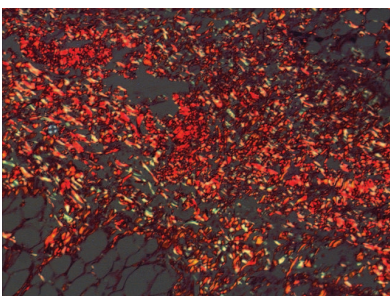
TABELA 3 –VALORES DA PORCENTAGEM DE COLÁGENO IMATURO DE ACORDO COM A VARIÁVEL TEMPO.

Tipo de colágeno	Tempo	Experimental (G2)		Controle (G1)		p
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
Colágeno Imaturo (Verde)	2	0,02	0,04	1,66	1,66	0,299
	7	1,79	2,33	1,17	1,21	0,997
	14	44,90	16,15	0,74	0,40	0,000*
	21	13,19	9,09	1,02	0,94	0,029*

FONTE: Dados da pesquisa, PUCPR, 2009.

NOTA: * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

O quadro abaixo mostra a avaliação quantitativa do colágeno entre o grupo experimental e controle.

Tempo	G1		G2	
2 dias	I			M
7 dias	J			N
14 dias	K			O
21 dias	L			P

Quadro 2: Fotomicrografia de lesão do músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos G1 e G2 nos períodos de 2, 7, 14 e 21 dias (aumento original de 200X, SR). Onde I,J,K,L representam o G1 e M,N,O,P representam o grupo controle.

DISCUSSÃO

A prática de exercícios físicos tem sido reconhecida há muitos anos como um redutor dos riscos de doenças cardiovasculares, doenças infecciosas e imunológicas. O estilo de vida sedentário tem sido abolido pela ciência e medicina, sendo um agravante nos processos patológicos. Para tanto o incentivo da atividade física diária tem sido crescente por parte dos profissionais da área da saúde.³

A resposta inflamatória representa um dos passos mais importantes do processo de reparo dos tecidos. Este processo tem por finalidade a restauração da estrutura e função tecidual frente a uma injúria. O exercício físico moderado realizado regularmente exerce papel benéfico sobre os leucócitos circulantes, níveis de citocinas inflamatórias e células de defesa em geral.^{7,18} Para estudar as influências do exercício sobre a resposta inflamatória e o processo de reparo utilizou-se o método de treinamento de Gonçalves (1999), onde se submeteu os ratos da linhagem Wistar à natação, após adequação dos mesmos foi induzida uma lesão ulcerada no músculo gastrocnêmio.

Na vigência da atividade física observa-se um aumento da capacidade do sistema imunológico melhorando a resposta do indivíduo frente a infecções e inflamações. Existe um incremento na melhora da resposta imunológica pela prática de exercícios físicos, podemos citar o trabalho de Gleeson (2007), que demonstrou o papel dos receptores (*Toll like receptors*) que são ativados durante os exercícios físicos e auxiliam na detecção de doenças infecciosas.⁸

O *status quo* é mantido pela liberação regular de catecolaminas, acetilcolina, cortisol, serotonina e outros, nas atividades físicas observam-se uma grande liberação desses mediadores que corroboram para a homeostasia.¹³

Existe uma interação entre a atividade física e a liberação de citocinas, que pode ser comprovado com o aumento destas na vigência do exercício e ainda com o aumento da produção do TNF- α . Estudos de Pedersen e Mathur (2008) demonstraram que em biopsias de músculo esquelético após o exercício houve uma alta concentração de IL-6 e proteínas antiinflamatórias que auxiliariam no aumento da atividade celular frente à inflamação.¹⁵ Estes achados corroboram aos do presente estudo que observou aumento na população de células polimorfonucleares

(neutrófilos) no período de 2 dias em ambos os grupos, porém de intensidade maior nos animais treinados. Sugere-se que esta diferença ocorra pela ativação exacerbada do sistema imunológico estimulada pela atividade física.

A presença de um infiltrado inflamatório crônico com predominância de células mononucleares foi observado aos 7 e 14 dias em ambos os grupos (Fig. G1 B e C). Aos 21 dias, no grupo controle, observou-se ainda a continuidade do infiltrado inflamatório crônico, enquanto que no grupo experimental as células mononucleares estavam dispersas no tecido muscular juntamente com os fibroblastos, sugerindo uma aceleração da reparação. Os macrófagos contribuem para a degradação de produtos resultantes da área inflamada e para o reparo tecidual. A administração subcutânea do hidróxido de sódio induziu a necrose tecidual e um aumento da população de células mononucleares locais. Em adição, estes têm a capacidade de liberar fatores e citocinas que também recrutam e ativam fibroblastos que participam ativamente na síntese do colágeno. Provavelmente a presença de células mononucleares (macrófagos) aos 21 dias no grupo sedentário se deve a agressão causada pelo hidróxido de sódio.¹

Os fibroblastos secretam matrizes precursoras de colágeno, durante o reparo tecidual esses continuam secretando citocinas e ainda perpetuam a liberação de prostaglandinas.¹ O presente estudo detectou a presença precoce de grande número de fibroblastos aos 7 dias somente nos animais treinados. Este fato deve-se provavelmente a uma ação catalisadora que a atividade física promove na cascata de eventos celulares durante o processo inflamatório.

Os linfócitos teciduais estão em equilíbrio dinâmico com aqueles do sangue, mas durante o exercício físico eles aumentam. No presente estudo detectou-se a presença de células mononucleares (linfócitos) logo no início da lesão no grupo experimental que perpetuou até os 14 dias no mesmo grupo. Este evento não procedeu no grupo controle, sugerindo desta forma que a atividade física promova motivação nas células de defesa.³

O colágeno no músculo desempenha uma variedade de funções mecânicas, imunológicas e de reparação tecidual. Exerce, ainda, um papel importante na transmissão da força produzida pela contração muscular ativa em músculos com diferentes funções. Essas variações contribuem para a melhoria das propriedades físicas e mecânicas do tecido.⁹

À medida que a região da lesão vai sendo coberta por células epiteliais é acionado o mecanismo de inibição por contato. As células voltam a apresentar o fenótipo original, a membrana basal é refeita e os hemidesmossomos e desmossomos são reconstituídos. Ao final desta etapa, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida pela neovascularização e a rede linfática passa por regeneração. Lentamente, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas.³

Na fase de remodelamento, por volta do décimo dia, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação com uma rede capilar atravessando-o e a rede linfática em franca regeneração. O tecido de granulação vai sendo enriquecido com mais fibras de colágeno, nesta etapa surgem às primeiras fibras de colágeno imaturo. Com a evolução deste processo, aumenta a deposição de colágeno. Esse fato procedeu-se nessa pesquisa, pois por volta do décimo quarto e vigésimo primeiro dia observou-se a maior quantidade de deposição de fibras colágenas imaturas em ambos os grupos, porém houve diferença estatística no grupo de animais treinados que expressou maior quantidade de colágeno jovem.³

O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno é feita a princípio de maneira aleatória. Ela tem como orientação a organização da fibronectina e está na dependência da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido.³ Nesse estudo, os eventos citados corroboram com os achados, visto que a birrefringência das fibras colágenas se apresentava de forma dispersa no campo de análise, sugerindo a aleatoriedade na formação das fibras.

Vários são os autores que relacionam o aumento da produção de colágeno com a atividade física. Tampelini (2007) demonstrou em seu estudo que os animais treinados tiveram um aumento na distribuição de colágeno imaturo, redução da pressão arterial, além de um aumento da elasticidade da musculatura vascular endotelial. Este achado converge aos do presente trabalho que verificou uma maior deposição de colágeno imaturo na região da musculatura ulcerada nos animais treinados^{15,17}.

As lesões que envolvem tecido cartilaginoso são reparadas mais rapidamente em decorrência da prática de exercício físico, pois ocorre uma grande deposição de colágeno imaturo nas fases iniciais de remodelamento.^{2,14} Observou-se também a presença de um amplo depósito de colágeno imaturo no período de 14 dias sendo

crescente e em maior deposição aos 21 dias, principalmente no grupo de animais treinados. Essa ação facilitadora sobre a produção de colágeno pode estar relacionada à ativação de mediadores químicos, neurohormônios que são amplamente liberados na atividade física. A diferenciação metabólica e o melhor aproveitamento dos recursos nutricionais são fatores que influenciam na formação do colágeno. Sugere-se que perante todos esses resultados a prática frequente e moderada de exercícios físicos seja um fator indispensável para a manutenção de uma condição ideal de homeostase, além de uma melhor qualidade de vida.

CONCLUSÃO

Dentro dos limites desta pesquisa pode-se concluir que a atividade física promoveu uma melhora da resposta inflamatória e um aumento da deposição de colágeno imaturo de lesões musculares, sugerindo que a prática de exercícios é um co-fator de ativação no processo de reparo.

REFERÊNCIAS

1. Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *Journal of Athletic Training*. 2006;41:457-465.
2. Espanha MM, Lammi PE, Hyttinen MM, Lammi MJ, Helminen HJ. Extracellular matrix composition of full-thickness defect repair tissue is little influenced by exercise in rat articular cartilage. *Connect Tissue Res*. 2001;42(2):97-109.
3. Febbraio MA. Exercise and inflammation. *J Appl Physiol*. 2007;103:376-377.
4. Fox EL, Foss ML, Keteyian SJF. Bases fisiológicas do exercício e do esporte. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
5. Gabriel H & Kindermann, W. The acute immune response to exercise: what does it? *International Journal Sports Medicine*. 1997;18:28-45.
6. Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, Da Cruz-Hofling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochen Photobiol B*. 2003;70:81-89.
7. Gonçalves AL. Respostas inflamatórias em ratos Wistar submetidas à atividades físicas. *Rev. Brasileira Atividade e Física Saúde, Rio Claro*. 1999;4(1):39-46.
8. Gleeson M. Immune function in sports and exercise. *J Appl Physiol*. In press; doi:10.1152/jappphysiol.00008.2007.
9. Imamura ST, Imamura, M, Hirose-Pastor E. Efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre o colágeno do músculo esquelético humano. *Rev. Bras. Reumatol*. 1999;39(1):35-40.

10. Leandro C et al. Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*. 2002;5(2):80-90.
11. Luz MMM, Luz FGR, Silva MFR, Oliveira CS, Da Mata FR, Da Mata JR. Efeito do laser As-Ga-Al de baixa potência sobre o músculo gastrocnêmio de rato submetido a lesão mecânica. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2007;4(2):159-168.
12. Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer GE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004;36:1031-1037.
13. Mottran DR. An introduction to drugs and their use in sport. 4th ed. 2005:1-9.
14. Nippon SGZ. The influence of the exercise in the healing of the rabbit. *Achilles tendon*. 1986;60:449-454.
15. Pedersen BK, Mathur N. Review article. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Hindawi Publishing Corporation, Mediators of Inflammation*. v. 2008, article ID 109502, 6 pages, doi: 10.1155/2008/109502.
16. Rezende MA, Gonçalves HH, Sabino GS, Pereira LSM, Francischi JN. Redução do efeito analgésico da estimulação elétrica nervosa transcutânea de baixa frequência em ratos tolerantes à morfina. *Rev. bras. fisioter., São Carlos*. 2006;3(10):291-296.
17. Tampelini FS. Efeito do exercício físico aeróbio sobre os componentes fibroelásticos e colágeno da aorta de rato normotensos e hipertensos, treinados e sedentários. 2007. Dissertação (mestrado em Ciências Morfofuncionais) - *Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo*. 2007.
18. Vaisberg MW & Rosa LFPBC. Influências do exercício na resposta imune. *Rev. Bras. Med. Esporte*. 2002;4(8):167-172.

19. Yamauchi C, Fujita S, Obara T, Ueda T. Effects of room temperature on reproduction, body and organ weights, food and water intake, and hematology in rats. *Lab Anim Sci*. 1981;31(3):251-258.

TITLE OF THE MANUSCRIPT

**EFFECT OF PHYSICAL ACTIVITY ON THE PROCESS OF REPAIR OF LESIONS
ON THE GASTROCNEMIUS MUSCLE OF RATS**

INTRODUCTION

A population that performs some type of moderate physical activity as a result have fewer diseases, a lower risk of developing cancer and infections, greater engagement in school work and less use of resources of health care. In a general context, the important role physical exercise on quality of life. The literature confirms a beneficial effect of physical activity on the relief of symptoms of depression and anxiety, improving the estate of mood and quality of life.⁴

Currently, the mechanisms by which exercise helps to reduce susceptibility to infection are not well known. One hypothesis states that physical exercise creates an environment hostile to invading pathogens. An example of this fact is the increase in body temperature that accompanies exercise. Another hypothesis argues that the exercise provides a favorable balance between the immune system, the organic response to stress and the release of neurohormones (cortisol and adrenaline). In addition, favorable changes occur in the components of the immune system.⁴

A regular physical activity performed while a inflammatory process reduces this response and thus interferes in the tissue recovery.⁷

During physical activity, you can see some changes in cells involved in the inflammatory process. About exercises of high intensity, it is possible to observe an increase in leukocytes, these cells may grow about 50 to 100% after physical activity. This increase in leukocyte activity is lower after a rest of 30 minutes due to the replacement of the physiological system.¹⁸ For acute exercise we also verify an increase in leukocyte activity.¹⁰

Other cellular components also change. The macrophages appear to be stimulated during physical stress and its functions are enhanced with an increase in the process of phagocytosis.¹⁸

The muscle is a tissue with property to adapt to physiological and pathological stimulus, and has a high degree of remodeling front of various stimulus. He is also frequently affected by trauma of daily life and the sports activities. Thus, the rapid recovery of this tissue with maintenance of its mechanical properties is important for the individual.¹¹

The repair process has different stages of tissue formation after injury. The phases of inflammation start as soon as the tissue damage and cellular components of the immune system starts to interact with the injured area contributing to tissue

repair, by the production of pro-inflammatory molecules and the synthesis of cell matrix.¹²

Accordingly, the proposal of this research was to determine the change in inflammatory response against the state of training and procedure for repair of muscle injury, between trained and sedentary animals, by means of a histological evaluation.

MATERIALS AND METHODS

For this study the project was evaluated and approved by the ethics committee in the use of animals (CEUA/PUCPR - 297/07). For this we used 62 male rats of Wistar strain aged approximately 45 to 50 days and average weight of 250g. The animals were fed with chow and water ad libitum and we respected the photoperiod of 12 hours light and 12 hours dark to avoid changes in the metabolic cycle (Yamauchi et al., 1981) 7. The animals were divided into 2 groups: a) experimental group (G1): 34 animals with muscle injury which practiced physical activities and b) Control group (G2): 28 sedentary animals carriers of muscle damage. Within each group the animals were divided into 4 groups for evaluation of the repair process after the installation of muscle damage. The periods of analysis were respectively: 2, 7, 14 and 21 days after the induction of muscle damage. Each group contained 7 animals with the exception of G1 in the periods of 14 and 21 days who had 10 animals. The repair process was evaluated without therapy interference, being attended only by the natural action of the body.

The animals in the experimental group (G1) underwent as a training swimming for 33 days according to the methodology described by Gonçalves (1999), respecting the periods of euthanasia for each subgroup (2,7,14 and 21 days), being 5 days of training and 2 days of rest.

The first week we performed the adaptation of animals to the aquatic environment starting by the training with 10 minutes, adding 10 minutes a day to the fifth day the animal had been swimming for 50 minutes. The second week, after the adjustment we added to the training a weight equivalent to 5% of the body weight was attached to the chest. This load was added, using an elastic, every day after weighing the animal putting the weight which was equivalent to the chest.⁷

In the third week, in 12^o day of training we did a ulceration in the gastrocnemius muscle of animals and even after the formation of the lesion the animals continued the training. After 2,7,14 and 21 days the induction of muscle damage the G1 animals were sacrificed, respecting the number of each subgroup. The sessions of swimming began at 8 am in container of asbestos (100cm x 70cm x 60cm) with 40cm of column water, to avoid that the rats's tail touch the bottom of the container. The water temperature showed a variation of 32°C to 25°C. After the

sessions of swimming, the rats were dry and returned to their cages in a room, with the temperature was 25°C.⁷

The animals in the control group (G2), although not submitted to swimming, were placed in water under the same conditions for approximately 2 minutes per day to mimic the neurophysiologic stimulus caused on the experimental group, so there wasn't variation on the responses of the repair process and the sympathetic nervous system.⁵

The ulcerated lesions in the gastrocnemius muscle of the right legs of rats were induced on the 12th day, by the application of 0.08 mL 40% of sodium hydroxide in subcutaneous. To achieve the lesion the animals were first anesthetized by an intraperitoneal injection of sodium thiopental @ 80mg/kg (Cristália, Brazil). For both groups, the lesions were in the third week after the beginning of the experiment.¹⁶

At the end of the experimental period the animals were euthanized by overdose of anesthetic solution (sodium thiopental, 150mg/kg).

For histological evaluation tissue segments covering the injured area were surgically removed (gastrocnemius muscle of the rat paw), then fixed in a 10% neutral formalin for 24 hours. The tissue specimens were dehydrated, and placed on paraffin. Slides 5 thick were colored using the techniques of hematoxylin-eosin (HE) and Picrosirius (SR) for evaluation of the repair process. The study of histological slides stained with HE was a blind type, conducted by an evaluator, properly calibrated. We evaluated the cells involved in inflammatory process showing the absence or presence of inflammatory infiltrate acute, chronic or mixed, were evaluated using light microscopy with an increase of 400X. The slides stained by Picrosirius were examined using light microscopy with polarization increase of 200X. The mature collagen has intense birefringence of colouration between yellow and red, while immature collagen produces green color under polarized light microscopy.⁶ The analysis of the percentage of collagen was performed using the software Image Pro-Plus 4.5 ® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), which calculated the percentage of mature and immature collagen. We analyzed two fields for each histological section.

Statistical analysis to test the normality of the variables for each group using the Kolmogorov-Smirnov test. The Levene test found homogeneity of variance between groups. For the second group independent samples using the Student t test.

In comparison between group and time variables using ANOVA followed by parametric test of Games-Howell for heterogeneous variances.

RESULTS

The macroscopic examination revealed a muscular hypertrophy and a smaller amount of fat in the vicinity of the gastrocnemius muscle where the lesion was induced in the experimental group compared to the control group. About the time of death of the animals in the G1 had a bigger resistance to the action of the anesthetic drug compared to G2, with a need for anesthetic supplementation up twice the usual dose.

Histologic examination showed cellular features characteristic between different groups of the experiment during the analyzed periods.

On the Period of 2 days the experimental group showed an intense acute inflammatory infiltrate with large numbers of polymorphonuclear cells (neutrophils) and few mononuclear cells (macrophages). The same procedure in the control group, however, the inflammatory infiltrate was smaller. Although it is noted in both groups between mononuclear cells, possibly the presence of lymphocytes. (Table 1 – Figure A,E).

At 7 days, both groups had a mixed inflammatory infiltrate. The experimental group showed a lower number of inflammatory mononuclear cells and the presence of fibroblasts was observed (Table 1 - Fig B, F). On the 14th day, the chronic inflammatory infiltrate was lower, we could observe areas where mononuclear cells are scattered in the damaged muscle and there is greater number of fibroblasts at the site. (Table 1 - Fig C, G).

In 21 days G1 group had small amount of inflammatory cells with the exception of fibroblasts. In G2 still had the presence of mononuclear inflammatory cells, possibly of macrophages, but in smaller quantities. (Table 1 – Fig D,H).

In all groups the presence of new vessels was visible, however the animals in the experimental group this formation was bigger.

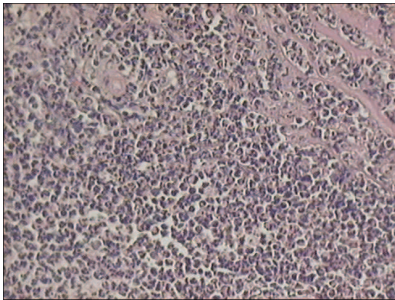
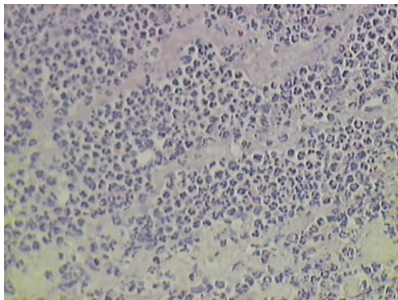
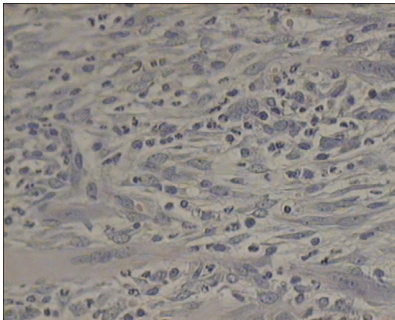
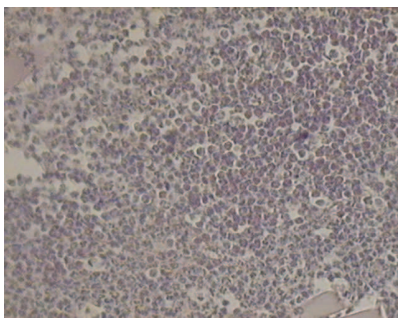
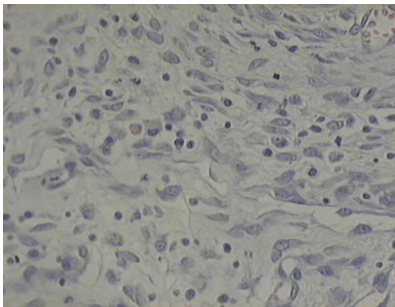
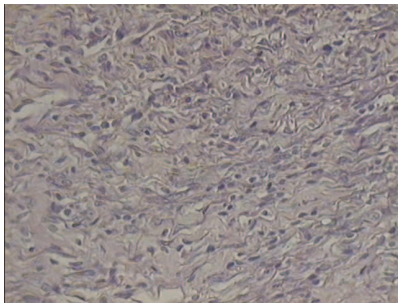
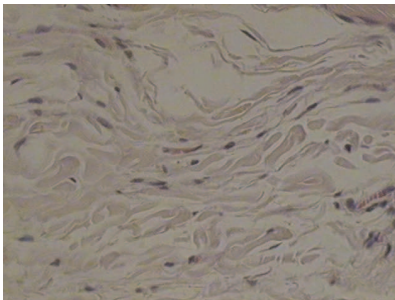
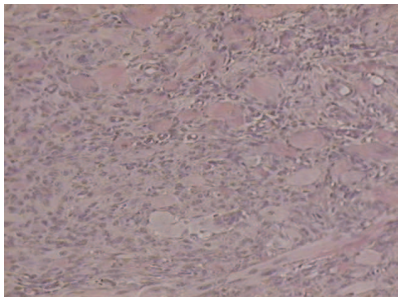
Time	G1	G2
2 days	A 	E 
7 days	B 	F 
14 days	C 	G 
21 days	D 	H 

Table 1: Photomicrograph of the área of the gastrocnemius muscle of rats in groups G1 and G2 during the periods of 2, 7, 14 and 21 days (increased from original 400X, HE).

QUANTITATIVE ANALYSIS

QUANTITATIVE EVALUATION OF COLLAGEN

When comparing the type of collagen formed between groups of independent variable time, the amount of mature collagen (red) was predominantly higher in the control group. While the experimental group had more deposition of immature collagen (green). Since $p < 0.05$ significant difference existed in the average percentage of mature and immature collagen between the groups (Table 1).

TABLE 1 – AVERAGE VALUES OF COLLAGEN PERCENTAGE OF MATURE AND IMMATURE

Percentage of area of Collagen	GROUPS		
	EXPERIMENTAL (G1)	CONTROL (G2)	p
Mature collagen (Red)	82,54 ± 21,09	98,85 ± 1,13	< 0,000 *
Immature collagen (Green)	17,46 ± 21,09	1,15 ± 1,13	< 0,000 *

SOURCE: Data from the survey, PUCPR, 2009.

NOTE: * Difference statistically significant ($p < 0.05$)

When comparing the groups of animals with variable time we had the following results: the control group showed no significant difference in the presence of mature collagen (red) during periods of 2 and 7 days (Table 2 - Figure I, M, J, N) as compared to the experimental group. With respect to periods of 14 and 21 days (Table 2 - Fig K, O, L, P) the difference of mature collagen was significant ($p < 0.05$), while the experimental group showed a smaller amount of such collagen (Table 2). Parameter referring to immature collagen (green) in periods of 2 and 7 days (Table 2 - Figure I, M, J, N) had no significant difference, however in periods of 14 and 21 days (Table 2 - Fig K, O, L, P) we had significant difference ($p < 0.05$), where G1 in the deposition of immature collagen was higher when compared to G2 (Table 3).

TABLE 2-VALUES OF THE PERCENTAGE OF COLLAGEN MATURE.

Type of collagen	Time	Exprimental (G1)		Control (G2)		p
		avarage	standard deviation	avarage	standard deviation	
Mature Collagen (Red)	2	98,98	0,04	98,34	1,66	< 0,299
	7	98,21	2,33	98,83	1,21	< 0,997
	14	55,10	16,15	99,26	0,40	< 0,000*
	21	86,81	9,09	98,98	0.94	< 0,029*

SOURCE: Data from the survey, PUCPR, 2009.

NOTE: * Difference statistically significant (p <0.05)

TABLE 3-VALUES OF THE PERCENTAGE OF COLLAGEN IMMATURE.

Type of collagen	Time	Exprimental (G2)		Control (G1)		p
		avarage	standard deviation	avarage	standard deviation	
Immature Collagen (Green)	2	0,02	0,04	1,66	1,66	0,299
	7	1,79	2,33	1,17	1,21	0,997
	14	44,90	16,15	0,74	0,40	0,000*
	21	13,19	9,09	1,02	0,94	0,029*

SOURCE: Data from the survey, PUCPR, 2009.

NOTE: * Difference statistically significant (p <0.05)

The table below shows the quantitative evaluation of collagen between the experimental group and control.

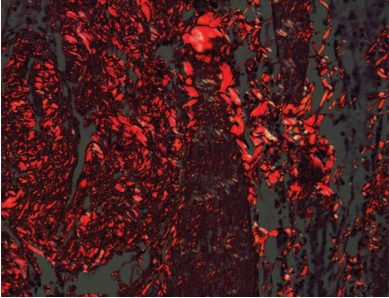
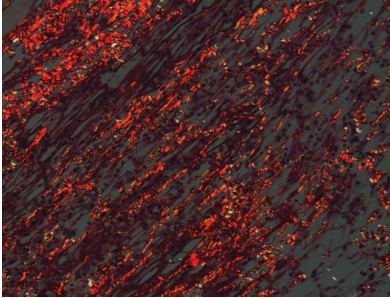
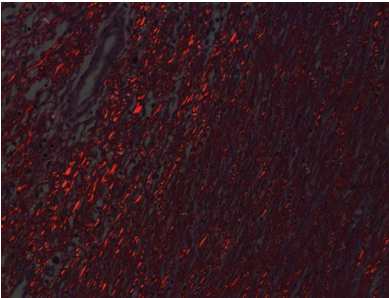
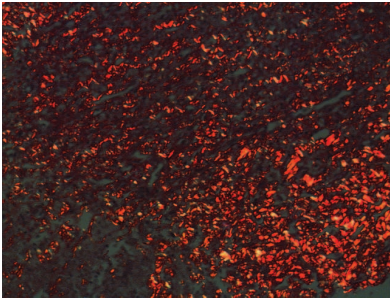
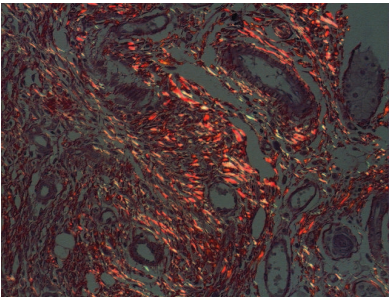
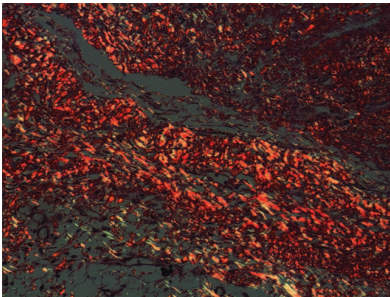
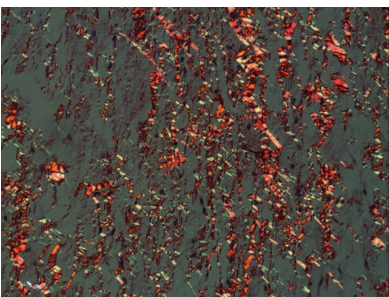
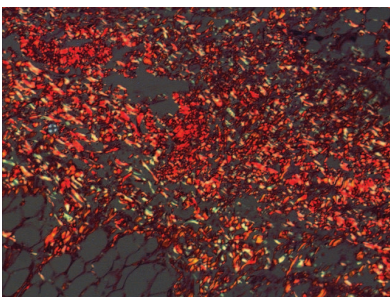
Time	G1	G2
2 days	I 	M 
7 days	J 	N 
14 days	K 	O 
21 days	L 	P 

Table 2: photomicrography of injury of the gastrocnemius muscle of rats in groups G1 and G2 during the periods of 2, 7, 14 and 21 days (increased from original 200X, SR). Where I, J, K, L represent the G1 and M, N, O, P are the control group.

DISCUSSION

The practice of physical exercise has been recognized for many years as a reducing risk of cardiovascular diseases, infectious and immunological diseases. The sedentary lifestyle has been abolished by science and medicine, being an aggravating factor in pathological processes. For both the encouragement of daily physical activity is increasing by health professionals.³

The inflammatory response is one of the most important steps of the repair tissue, this process is to restore the structure and function of a tissue when it has a injury. A moderate Exercise regularly performed have a beneficial role on the circulating leukocytes, levels of inflammatory cytokines and defense cells in general.^{7,18} To study the influence of exercise on the inflammatory response and the repair process using the training method of Gonçalves (1999), where the lineage Wistar rats subjected to swimming, after adequation of it an ulcerated lesion was induced in the gastrocnemius muscle.

During physical activity there is an increased ability of the immune system by improving the response of the individual against infections and inflammations. There are several authors who reported the improvement of immune response by the practice of physical exercises, among them we can mention the work of Gleeson (2007), which demonstrated the role of receptors (Tool like receptors) that are activated during the exercise and help the detection of infectious diseases.⁸

The status quo is maintained by the regular release of catecholamines, acetylcholine, cortisol, serotonin and others in physical activity there are a release of this mediators that support for the homeostasis.¹³

There is an interaction between physical activity and release of cytokines, which can be seen with the increase of during the exercise and with the increased production of TNF- α . Studies of Pedersen and Mathur (2008) 12 demonstrated that in biopsies of skeletal muscle after exercise there is a high concentration of IL-6 and anti-inflammatory proteins that help in increasing the cellular activity against the inflammation.¹⁵ These findings corroborate those of this study that observed an increase in the population of neutrophils in the period of 2 days in both groups, but of greater intensity in the experimental group. It is suggested that this difference occurs exacerbated by activation of the immune system stimulated by physical activity.

The presence of a chronic inflammatory infiltrate with predominance of mononuclear cells was observed at 7 and 14 days in both groups (G1 Fig. B and C). To 21 days in the control group also noted the continuation of the chronic inflammatory infiltrate, while in the experimental group the mononuclear cells are dispersed in tissue together with the fibroblasts, suggesting a better repair. The macrophages contribute to the degradation of products from the inflamed area and the tissue repair. The subcutaneous administration of sodium hydroxide induced necrosis and increase the local population of mononuclear cells. In addition, they have the ability to release factors and cytokines that recruit and activate fibroblasts actively involved in the synthesis of collagen. Probably the presence of macrophages at 21 days in the sedentary group was due to aggression caused by sodium hydroxide.¹

The fibroblasts secrete matrix precursor of collagen. During tissue repair the fibroblasts remain secreted cytokines and perpetuate the release of prostaglandins.¹ This study detected the presence of early large number of fibroblasts at 7 days only in animals trained. This is due probably to a catalytic action which promotes physical activity in the cascade of cellular events during the inflammatory process.

Lymphocytes in the tissue are dynamic equilibrium with those of blood, but during exercise they increase. In the present study detected the presence of lymphocytes at the beginning of the lesion in the experimental group that perpetuated up to 14 days in the same group. This event has not in the control group, thus suggesting that the motivation to promote physical activity in the cells of defense.³ The muscle collagen plays a variety of mechanical functions, immune and tissue repair. Exercise, also play an important role in the transmission of force produced by muscle contraction in active muscles with different functions. These variations contribute to the improvement of physical and mechanical properties of tissue.⁹

As the region of injury is being covered by epithelial cells is driven by the mechanism of contact inhibition. The cells again show the original phenotype, the basement membrane and hemidesmosome is repeated and desmosomes are replenished. At the end of this stage the wound is completely filled by granulation tissue, the circulation is restored by the lymphatic vessels and the network goes through regeneration. Slowly the granulation tissue is enriched with more collagen fibers.³

During remodeling around the tenth day the wound is completely filled by granulation tissue with a current capillary and across-the current lymphatic in regeneration. The granulation tissue is being enriched with more fibers of collagen, in this step appears the first immature collagen fibers. With the evolution of this process increases the deposition of collagen. This fact was made in this study, around the fourteenth and twenty first day there was a greater amount of deposition of immature collagen fibers in both groups, but there was statistical difference in the group of trained animals that expressed greater amounts of collagen young.³

The process of remodeling the scar involves successive stages of production, digestion and the orientation of collagen fibrils. The deposition of collagen is made of random having as a orientation the organization of fibronectin and dependent on the nature and direction of tension applied to the tissue.³ The events cited in this study corroborate the findings, since the birefringence of collagen fibers are present in dispersed form in the field of analysis, suggesting the randomness in the formation of fibers.

There are several authors (PEDERSEN, 2008; TAMPELINI, 2007) relate the increase production of collagen with physical activity. Tampelini (2007) in his study showed that the trained animals had an increase in the distribution of immature collagen, reduction of hypertension, and increased elasticity of vascular endothelial muscle. This finding converges to the present study found that increased deposition of young collagen in the ulcerated muscles of trained animals.

The lesions involving cartilaginous tissue and the practice of physical exercise are repaired quicker because there is a great deposition of young collagen in the early stages of remodeling.^{2,14} There was also the presence of a large deposit of immature collagen in the period of 14 days being increased and in bigger deposition at 21 days, mainly in the group of trained animals. This action facilitates the production of collagen is due by the activation of chemical mediators, neurohormones that are widely released in physical activity. The metabolic differentiation and better utilization of nutritional resources are factors that influence the formation of collagen. It is suggested that all these results of practice of frequent and moderate exercise is an essential factor for the maintenance of an ideal condition of homeostasis, in addition a better quality of life.

CONCLUSION

Within the limits of this research we can conclude that physical activity promotes an increase of collagen deposition in immature muscle injury, suggesting that the practice of exercises is a co-factor of activation in the repair process.

REFERENCES

- 1-Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *Journal of Athletic Training*. 2006;41:457-465.
- 2-Espanha MM, Lammi PE, Hyttinen MM, Lammi MJ, Helminen HJ. Extracellular matrix composition of full-thickness defect repair tissue is little influenced by exercise in rat articular cartilage. *Connect Tissue Res*. 2001;42(2):97-109.
- 3-Febbraio MA. Exercise and inflammation. *J Appl Physiol*. 2007;103:376-377.
- 4-Fox EL, Foss ML, Keteyian SJF. Bases fisiológicas do exercício e do esporte. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- 5-Gabriel H & Kindermann, W. The acute immune response to exercise: what does it? *International Journal Sports Medicine*. 1997;18:28-45.
- 6-Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, Da Cruz-Hofling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochen Photobiol B*. 2003;70:81-89.
- 7-Gonçalves AL. Respostas inflamatórias em ratos Wistar submetidas à atividades físicas. *Rev. Brasileira Atividade e Física Saúde, Rio Claro*. 1999;4(1):39-46.
- 8-Gleeson M. Immune function in sports and exercise. *J Appl Physiol*. In press; doi:101152/japplphysiol.00008.2007.
- 9-Imamura ST, Imamura, M, Hirose-Pastor E. Efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre o colágeno do músculo esquelético humano. *Rev. Bras. Reumatol*. 1999;39(1):35-40.

10-Leandro C et al. Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*.2002;5(2):80-90.

11-Luz MMM, Luz FGR, Silva MFR, Oliveira CS, Da Mata FR, Da Mata JR. Efeito do laser As-Ga-Al de baixa potência sobre o músculo gastrocnêmio de rato submetido a lesão mecânica. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2007;4(2):159-168.

12-Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer GE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004;36:1031-1037.

13-Mottran DR. An introduction to drugs and their use in sport. 4th ed. 2005:1-9.

14-Nippon SGZ. The influence of the exercise in the healing of the rabbit. *Achilles tendon*.1986;60:449-454.

15-Pedersen BK, Mathur N. Review article. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Hindawi Publishing Corporation, Mediators of Inflammation*. v. 2008, article ID 109502, 6 pages, doi: 10.1155/2008/109502.

16-Rezende MA, Gonçalves HH, Sabino GS, Pereira LSM, Francischi JN. Redução do efeito analgésico da estimulação elétrica nervosa transcutânea de baixa frequência em ratos tolerantes à morfina. *Rev. bras. fisioter., São Carlos*. 2006;3(10):291-296.

17-Tampelini FS. Efeito do exercício físico aeróbio sobre os componentes fibroelásticos e colágeno da aorta de rato normotensos e hipertensos, treinados e sedentários. 2007. Dissertação (mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2007.

18-Vaisberg MW & Rosa LFPBC. Influências do exercício na resposta imune. *Rev. Bras. Med. Esporte*. 2002;4(8):167-172.

19-Yamauchi C, Fujita S, Obara T, Ueda T. Effects of room temperature on reproduction, body and organ weights, food and water intake, and hematology in rats. *Lab Anim Sci.* 1981;31(3):251-258.

ANEXO A

Materiais e Métodos

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade do Paraná (PUCPR) sob registro n° 279/07

Seleção da Amostra

A amostra foi constituída por 62 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com idade aproximada de 45 a 50 dias, pesando aproximadamente entre 250 a 300g, provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

O método experimental e todos os experimentos realizados obedeceram às recomendações éticas, legais e de biossegurança especificadas para experimentação animal.⁴ Animais machos foram utilizados para eliminar qualquer variabilidade hormonal devido ao ciclo reprodutivo da fêmea. O período de aclimação não foi necessário devido ao nascimento e ao experimento serem realizados no mesmo ambiente (Biotério PUCPR).

Acondicionamento da Amostra

Durante o período experimental os animais permaneceram no Biotério da PUCPR e foram acondicionados em gaiolas contendo 3 animais em cada. A gaiola-viveiro foi constituída de caixas de propileno semi-fosco com locais específicos para colocação de alimento e água. Durante todo o experimento, as gaiolas permaneceram forradas com cepilho (*maravalha de pinus*), com a finalidade de absorver a urina dos animais e a água derramada no seu interior, manter o fundo sempre seco, e servir de isolante térmico, a fim de reduzir a condução de calor do corpo dos animais.

As raspas de madeira foram substituídas diariamente para evitar o acúmulo de gases tóxicos (amônia e sulfeto de hidrogênio) resultantes da degradação oxidativa e bacteriana dos excrementos, oferecendo assim, condições favoráveis de higiene, conforto e bem-estar.¹

Foram utilizados dispensadores de vidro para água, com bico de aço inoxidável, com capacidade para 500ml, disponíveis permanentemente na gaiola para garantir suprimento constante de água mineral aos animais.

Foi realizado controle de fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro para evitar alterações no ciclo metabólico.⁵ Cada animal recebeu uma identificação para atender os objetivos dos autores. Com o objetivo de observar alterações de peso e para o cálculo e ajustes das dosagens da medicação que foi administrada, os animais foram pesados no início da pesquisa e diariamente, até sua conclusão com o auxílio de balança eletrônica de precisão (Gehaka – BG 4001).

Grupo Experimental (G1)

Os animais deste grupo realizaram como treinamento a natação por 33 dias, respeitando os períodos de eutanásia de cada subgrupo (2, 7, 14 e 21 dias), sendo 5 dias de treino e 2 dias de repouso. Na primeira semana realizou-se a adaptação dos animais ao ambiente aquático, iniciando o treinamento com 10 minutos, acrescentando 10 minutos diários para que ao quinto dia os animais já estivessem nadando por 50 minutos. Na segunda semana, após a adaptação acrescentou-se ao treinamento uma carga equivalente a 5% do peso corporal acoplada ao tórax.³ Esta carga foi acrescentada diariamente após pesagem do animal colando-se o peso equivalente ao tórax, utilizando um elástico. Na terceira semana, no 12º dia de treinamento realizou-se a ulceração no músculo gastrocnêmio dos animais e mesmo após o início de formação da lesão os animais continuaram o treinamento. Após 2 dias o primeiro grupo de animais G1 no período de 2 dias foram sacrificados. Na quarta semana no 19º dia de treinamento os animais no período de 7 foram sacrificados. Na quinta semana no 25º dia de treinamento os animais no período de 14 dias foram sacrificados. Na sexta semana os animais do subgrupo de 21 dias continuaram o treinamento e na sétima semana no 33º dia os últimos animais foram sacrificados. As sessões de natação iniciaram às 8 horas em recipiente de amianto (100cm x 70cm x 60cm) com coluna de água de 40cm, para evitar que os ratos apoiassem a

cauda no fundo do recipiente. A temperatura da água foi mantida em $32 \pm 1^\circ \text{C}$. Após o término das sessões de natação, os ratos eram enxugados e retornados às suas respectivas gaiolas em sala com temperatura de 25°C .

Grupo Controle (G2)

Apesar de não submetidos à natação, os animais foram colocados na água nas mesmas condições anteriores por aproximadamente 2 minutos por dia para simular a manipulação dos animais dos grupos anteriores.

Ulceração

As lesões ulceradas no músculo gastrocnêmio das patas dos ratos foram induzidas pela aplicação de 0,08 mL de hidróxido de sódio a 40% de forma sub-cutânea. Para realização da lesão os animais foram previamente anestesiados por meio de uma injeção intraperitoneal de tiopental sódico® (Cristália, Brasil, 80 mg/kg). Para ambos os grupos, as lesões foram realizadas na terceira semana após o início do experimento.



Figura 1: Local de administração sub-cutânea de NaOH para indução da lesão muscular

Eutanásia dos animais, obtenção e preparo dos espécimes

Ao término do período experimental os animais foram eutanasiados por overdose de solução anestésica (tiopental sódico, 150 mg/Kg).

Análise histológica

Após a eutanásia correta, realizou-se as análises histológicas dos tecidos retirados dos animais desse estudo. Foram removidos os segmentos teciduais abrangendo a área lesionada (músculo gastrocnêmio da pata do rato). Os espécimes teciduais foram colocados em recipiente previamente identificado contendo solução fixadora de formalina neutra a 10% e enviado ao laboratório de Patologia Experimental da PUCPR. Decorrido o período mínimo de 24 horas para a fixação, a parte do músculo gastrocnêmio contendo a área lesionada foi seccionada transversalmente para observar epitélio e tecido conjuntivo, desidratada em álcool, diafanizada em xilol e incluída em blocos de parafina de acordo com a técnica histológica convencional. Os blocos foram montados em micrótomo e obtidos cortes com cinco micrômetros (μm) de espessura e coradas com hematoxilina-eosina (HE).

Análise histológica

Segmentos teciduais abrangendo a área lesionada foram removidos cirurgicamente e (músculo gastrocnêmio da pata do rato), depois fixados em formalina neutra a 10%. Os espécimes teciduais foram desidratados, diafanizados e emblocados em parafina. Lâminas com 4 μm de espessura foram coradas pelas técnicas da hematoxilina-eosina (HE) e Picrossirius Red (SR) para avaliação do processo de reparo. O estudo histológico das lâminas coradas com HE foi do tipo cego, conduzido por um avaliador, devidamente calibrado. Os parâmetros avaliados foram as células envolvidas no processo inflamatório quantificados sob microscopia de luz com um aumento original de 400X. As lâminas coradas por Picrossirius foram analisadas sob microscopia de luz polarizada com aumento original de 200X. O colágeno maduro apresenta birrefringência intensa, de coloração entre amarelo e

vermelho, enquanto o colágeno imaturo produz coloração esverdeada sob microscopia de luz polarizada.² A análise do percentual de colágeno foi realizada por meio do *software* 4,5 Image Pro-Plus® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), que calculou a porcentagem de colágeno maduro e imaturo. Foram analisados 2 campos para cada corte histológico.

REFERÊNCIAS DA METODOLOGIA

- 1- Baker DEJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. The Laboratory Rat. *Academic Press*. 1979:169-172.
- 2- Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, Da Cruz-Hofling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B*. 2003;70:81-89.
- 3- Gonçalves AL. Respostas inflamatórias em ratos Wistar submetidas à atividades físicas. *Rev. Brasileira Atividade e Física Saúde, Rio Claro*. 1999;4(1):39-46.
- 4- Rowsell HC. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1986;554:95-105
- 5- Yamauchi C, Fujita S, Obara T, Ueda T. Effects of room temperature on reproduction, body and organ weights, food and water intake, and hematology in rats. *Lab Anim Sci*. 1981;31(3):251-258.

ANEXO B

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão
Percentagem da Área de Colágeno Vermelho	Animais Sedentários	28	98,85	99,25	1,13	0,21
	Animais Treinados	34	82,54	91,42	21,09	3,62
Percentagem da Área de Colágeno Verde	Animais Sedentários	28	1,15	0,75	1,13	0,21
	Animais Treinados	34	17,46	8,58	21,09	3,62

Variável	Grupo x Tempo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão
Percentagem da Área de Colágeno Vermelho	Animais Sedentários 2 dias	7	98,34	98,65	1,66	0,63
	Animais Sedentários 7 dias	7	98,83	99,36	1,21	0,46
	Animais Sedentários 14 dias	7	99,26	99,23	0,40	0,15
	Animais Sedentários 21 dias	7	98,98	99,27	0,94	0,35
	Animais Treinados 2 dias	7	99,98	99,99	0,04	0,02
	Animais Treinados 7 dias	7	98,21	98,91	2,33	0,88
	Animais Treinados 14 dias	10	55,10	53,22	16,15	5,11
	Animais Treinados 21 dias	10	86,81	89,73	9,09	2,87
Percentagem da Área de Colágeno Verde	Animais Sedentários 2 dias	7	1,66	1,35	1,66	0,63
	Animais Sedentários 7 dias	7	1,17	0,64	1,21	0,46
	Animais Sedentários 14 dias	7	0,74	0,77	0,40	0,15
	Animais Sedentários 21 dias	7	1,02	0,73	0,94	0,35
	Animais Treinados 2 dias	7	0,02	0,01	0,04	0,02
	Animais Treinados 7 dias	7	1,79	1,09	2,33	0,88
	Animais Treinados 14 dias	10	44,90	46,78	16,15	5,11
	Animais Treinados 21 dias	10	13,19	10,28	9,09	2,87

Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov

Variável	Grupo x Tempo	Statistic	df	Valor p
Percentagem da Área de Colágeno Vermelho	Animais Sedentários 2 dias	0,222183	7	0,2000
	Animais Sedentários 7 dias	0,317325	7	0,0318
	Animais Sedentários 14 dias	0,182683	7	0,2000
	Animais Sedentários 21 dias	0,197524	7	0,2000
	Animais Treinados 2 dias	0,455849	7	0,0001
	Animais Treinados 7 dias	0,304681	7	0,0500
	Animais Treinados 11 dias	0,16522	10	0,2000
	Animais Treinados 21 dias	0,244583	10	0,0918
Percentagem da Área de Colágeno Verde	Animais Sedentários 2 dias	0,222183	7	0,2000
	Animais Sedentários 7 dias	0,317325	7	0,0318
	Animais Sedentários 14 dias	0,182683	7	0,2000
	Animais Sedentários 21 dias	0,197524	7	0,2000
	Animais Treinados 2 dias	0,455849	7	0,0001
	Animais Treinados 7 dias	0,304681	7	0,0500
	Animais Treinados 11 dias	0,16522	10	0,2000
	Animais Treinados 21 dias	0,244583	10	0,0918

Quando $p < 0,05$ OS GRUPOS X TEMPO APRESENTAM DISTRIBUIÇÃO NORMAL

Os GRUPOS X TEMPO QUE NÃO APRESENTARAM DIST. NORMAL, APRESENTAM DIST. SIMÉTRICA, UMA VEZ QUE APRESENTARAM VALORES DA MÉDIA E MEDIANA PRÓXIMOS.

Teste de Homogeneidade de Variâncias de Levene entre Grupo x Tempo

	Levene Statistic	df1	df2	Valor p
Percentagem da Área de Colágeno Vermelho	9,275291977	7	54,0000	0,0000
Percentagem da Área de Colágeno Verde	9,275291977	7	54,0000	0,0000

UMA VEZ QUE $p < 0,05$ AMBAS AS VARIÁVEIS NÃO APRESENTAM HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS ENTRE GRUPOS X TEMPO

T-Test

Group Statistics	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
Percentagem da Área de Colágeno Vermelho	Animais Sedentários	28	98,85	1,13	0,21
	Animais Treinados	34	82,54	21,09	3,62
Percentagem da Área de Colágeno Verde	Animais Sedentários	28	1,15	1,13	0,21
	Animais Treinados	34	17,46	21,09	3,62

INDEPENDENT SAMPLES TEST

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Valor p	t	df	Valor p	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Percentagem da Área de Colágeno Vermelho	Equal variances not assumed	54,729	0,000	4,501	33,232	0,000	16,311	3,624	8,940	23,682
Percentagem da Área de Colágeno Verde	Equal variances not assumed	54,729	0,000	-4,501	33,232	0,000	-16,311	3,624	-23,682	-8,940

UMA VEZ QUE $p < 0,05$ EXISTE DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE NA PERCENTAGEM MÉDIA DA ÁREA DE COLÁGENO VERMELHO E VERDE ENTRE GRUPO

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: Percentagem da Área de Colágeno Vermelho

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Observed Power(a)
Corrected Model	15648,359	7,000	2235,480	38,253	0,000	1,000
Intercept	511725,119	1,000	511725,119	8756,492	0,000	1,000
GrupoxTempo	15648,359	7,000	2235,480	38,253	0,000	1,000
Error	3155,734	54,000	58,440			
Total	519971,424	62,000				
Corrected Total	18804,093	61,000				

Multiple Comparisons
Dependent Variable: Percentagem da Área de Colágeno Vermelho
Games-Howell

(I) Grupo x Tempo	(J) Grupo x Tempo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Animais Sedentários 2 dias	Animais Sedentários 7 dias	-0,496	0,777	0,997	-3,355	2,364
	Animais Sedentários 14 dias	-0,921	0,645	0,820	-3,613	1,770
	Animais Sedentários 21 dias	-0,643	0,721	0,980	-3,378	2,092
	Animais Treinados 2 dias	-1,643	0,628	0,300	-4,358	1,073
	Animais Treinados 7 dias	0,131	1,083	1,000	-3,864	4,127
	Animais Treinados 14 dias	43,239	5,146	0,000	23,611	62,867
	Animais Treinados 21 dias	11,525	2,942	0,040	0,452	22,598
Animais Sedentários 7 dias	Animais Sedentários 2 dias	0,496	0,777	0,997	-2,364	3,355
	Animais Sedentários 14 dias	-0,426	0,483	0,979	-2,389	1,537
	Animais Sedentários 21 dias	-0,147	0,580	1,000	-2,270	1,976
	Animais Treinados 2 dias	-1,147	0,459	0,339	-3,133	0,839
	Animais Treinados 7 dias	0,627	0,995	0,997	-3,191	4,445
	Animais Treinados 14 dias	43,735	5,128	0,000	24,113	63,357
	Animais Treinados 21 dias	12,021	2,911	0,031	0,967	23,075
Animais Sedentários 14 dias	Animais Sedentários 2 dias	0,921	0,645	0,820	-1,770	3,613
	Animais Sedentários 7 dias	0,426	0,483	0,979	-1,537	2,389
	Animais Sedentários 21 dias	0,279	0,385	0,993	-1,241	1,798
	Animais Treinados 2 dias	-0,721	0,151	0,031	-1,369	-0,074
	Animais Treinados 7 dias	1,053	0,895	0,915	-2,747	4,853
	Animais Treinados 14 dias	44,161	5,110	0,000	24,543	63,778
	Animais Treinados 21 dias	12,447	2,879	0,026	1,405	23,489
Animais Sedentários 21 dias	Animais Sedentários 2 dias	0,643	0,721	0,980	-2,092	3,378
	Animais Sedentários 7 dias	0,147	0,580	1,000	-1,976	2,270
	Animais Sedentários 14 dias	-0,279	0,385	0,993	-1,798	1,241
	Animais Treinados 2 dias	-1,000	0,355	0,243	-2,535	0,535
	Animais Treinados 7 dias	0,774	0,951	0,987	-3,004	4,552
	Animais Treinados 14 dias	43,882	5,120	0,000	24,262	63,502
	Animais Treinados 21 dias	12,168	2,896	0,029	1,121	23,215
Animais Treinados 2 dias	Animais Sedentários 2 dias	1,643	0,628	0,300	-1,073	4,358
	Animais Sedentários 7 dias	1,147	0,459	0,339	-0,839	3,133
	Animais Sedentários 14 dias	0,721	0,151	0,031	0,074	1,369
	Animais Sedentários 21 dias	1,000	0,355	0,243	-0,535	2,535
	Animais Treinados 7 dias	1,774	0,883	0,539	-2,046	5,595
	Animais Treinados 14 dias	44,882	5,107	0,000	25,265	64,499
	Animais Treinados 21 dias	13,168	2,875	0,018	2,127	24,209

Animais Treinados 7 dias	Animais Sedentários 2 dias	-0,131	1,083	1,000	-4,127	3,864
	Animais Sedentários 7 dias	-0,627	0,995	0,997	-4,445	3,191
	Animais Sedentários 14 dias	-1,053	0,895	0,915	-4,853	2,747
	Animais Sedentários 21 dias	-0,774	0,951	0,987	-4,552	3,004
	Animais Treinados 2 dias	-1,774	0,883	0,539	-5,595	2,046
	Animais Treinados 14 dias	43,108	5,183	0,000	23,463	62,753
	Animais Treinados 21 dias	11,394	3,007	0,044	0,258	22,529
Animais Treinados 14 dias	Animais Sedentários 2 dias	-43,239	5,146	0,000	-62,867	-23,611
	Animais Sedentários 7 dias	-43,735	5,128	0,000	-63,357	-24,113
	Animais Sedentários 14 dias	-44,161	5,110	0,000	-63,778	-24,543
	Animais Sedentários 21 dias	-43,882	5,120	0,000	-63,502	-24,262
	Animais Treinados 2 dias	-44,882	5,107	0,000	-64,499	-25,265
	Animais Treinados 7 dias	-43,108	5,183	0,000	-62,753	-23,463
	Animais Treinados 21 dias	-31,714	5,861	0,002	-52,354	-11,074
Animais Treinados 21 dias	Animais Sedentários 2 dias	-11,525	2,942	0,040	-22,598	-0,452
	Animais Sedentários 7 dias	-12,021	2,911	0,031	-23,075	-0,967
	Animais Sedentários 14 dias	-12,447	2,879	0,026	-23,489	-1,405
	Animais Sedentários 21 dias	-12,168	2,896	0,029	-23,215	-1,121
	Animais Treinados 2 dias	-13,168	2,875	0,018	-24,209	-2,127
	Animais Treinados 7 dias	-11,394	3,007	0,044	-22,529	-0,258
	Animais Treinados 14 dias	31,714	5,861	0,002	11,074	52,354

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the ,05 level.

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: Percentagem da Área de Colágeno Verde

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Observed Power(a)
Corrected Model	15648,35912	7	2235,4799	38,252884	0,000000	1,00000
Intercept	3934,848666	1	3934,8487	67,33199	0,000000	1,00000
GrupoxTempo	15648,35912	7	2235,4799	38,252884	0,000000	1,00000
Error	3155,733663	54	58,439512			
Total	25119,4242	62				
Corrected Total	18804,09279	61				

Multiple Comparisons
Dependent Variable: Percentagem da Área de Colágeno Verde
Games-Howell

(I) Grupo x Tempo	(J) Grupo x Tempo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Animais Sedentários 2 dias	Animais Sedentários 7 dias	0,496	0,777	0,997	-2,364	3,355
	Animais Sedentários 14 dias	0,921	0,645	0,820	-1,770	3,613
	Animais Sedentários 21 dias	0,643	0,721	0,980	-2,092	3,378
	Animais Treinados 2 dias	1,643	0,628	0,300	-1,073	4,358
	Animais Treinados 7 dias	-0,131	1,083	1,000	-4,127	3,864
	Animais Treinados 14 dias	-43,239	5,146	0,000	-62,867	-23,611
	Animais Treinados 21 dias	-11,525	2,942	0,040	-22,598	-0,452

Animais Sedentários 7 dias	Animais Sedentários 2 dias	-0,496	0,777	0,997	-3,355	2,364
	Animais Sedentários 14 dias	0,426	0,483	0,979	-1,537	2,389
	Animais Sedentários 21 dias	0,147	0,580	1,000	-1,976	2,270
	Animais Treinados 2 dias	1,147	0,459	0,339	-0,839	3,133
	Animais Treinados 7 dias	-0,627	0,995	0,997	-4,445	3,191
	Animais Treinados 14 dias	-43,735	5,128	0,000	-63,357	-24,113
	Animais Treinados 21 dias	-12,021	2,911	0,031	-23,075	-0,967
Animais Sedentários 14 dias	Animais Sedentários 2 dias	-0,921	0,645	0,820	-3,613	1,770
	Animais Sedentários 7 dias	-0,426	0,483	0,979	-2,389	1,537
	Animais Sedentários 21 dias	-0,279	0,385	0,993	-1,798	1,241
	Animais Treinados 2 dias	0,721	0,151	0,031	0,074	1,369
	Animais Treinados 7 dias	-1,053	0,895	0,915	-4,853	2,747
	Animais Treinados 14 dias	-44,161	5,110	0,000	-63,778	-24,543
	Animais Treinados 21 dias	-12,447	2,879	0,026	-23,489	-1,405
Animais Sedentários 21 dias	Animais Sedentários 2 dias	-0,643	0,721	0,980	-3,378	2,092
	Animais Sedentários 7 dias	-0,147	0,580	1,000	-2,270	1,976
	Animais Sedentários 14 dias	0,279	0,385	0,993	-1,241	1,798
	Animais Treinados 2 dias	1,000	0,355	0,243	-0,535	2,535
	Animais Treinados 7 dias	-0,774	0,951	0,987	-4,552	3,004
	Animais Treinados 14 dias	-43,882	5,120	0,000	-63,502	-24,262
	Animais Treinados 21 dias	-12,168	2,896	0,029	-23,215	-1,121
Animais Treinados 2 dias	Animais Sedentários 2 dias	-1,643	0,628	0,300	-4,358	1,073
	Animais Sedentários 7 dias	-1,147	0,459	0,339	-3,133	0,839
	Animais Sedentários 14 dias	-0,721	0,151	0,031	-1,369	-0,074
	Animais Sedentários 21 dias	-1,000	0,355	0,243	-2,535	0,535
	Animais Treinados 7 dias	-1,774	0,883	0,539	-5,595	2,046
	Animais Treinados 14 dias	-44,882	5,107	0,000	-64,499	-25,265
	Animais Treinados 21 dias	-13,168	2,875	0,018	-24,209	-2,127
Animais Treinados 7 dias	Animais Sedentários 2 dias	0,131	1,083	1,000	-3,864	4,127
	Animais Sedentários 7 dias	0,627	0,995	0,997	-3,191	4,445
	Animais Sedentários 14 dias	1,053	0,895	0,915	-2,747	4,853
	Animais Sedentários 21 dias	0,774	0,951	0,987	-3,004	4,552
	Animais Treinados 2 dias	1,774	0,883	0,539	-2,046	5,595
	Animais Treinados 14 dias	-43,108	5,183	0,000	-62,753	-23,463
	Animais Treinados 21 dias	-11,394	3,007	0,044	-22,529	-0,258
Animais Treinados 14 dias	Animais Sedentários 2 dias	43,239	5,146	0,000	23,611	62,867
	Animais Sedentários 7 dias	43,735	5,128	0,000	24,113	63,357
	Animais Sedentários 14 dias	44,161	5,110	0,000	24,543	63,778
	Animais Sedentários 21 dias	43,882	5,120	0,000	24,262	63,502
	Animais Treinados 2 dias	44,882	5,107	0,000	25,265	64,499
	Animais Treinados 7 dias	43,108	5,183	0,000	23,463	62,753
	Animais Treinados 21 dias	31,714	5,861	0,002	11,074	52,354
Animais Treinados 21 dias	Animais Sedentários 2 dias	11,525	2,942	0,040	0,452	22,598
	Animais Sedentários 7 dias	12,021	2,911	0,031	0,967	23,075
	Animais Sedentários 14 dias	12,447	2,879	0,026	1,405	23,489
	Animais Sedentários 21 dias	12,168	2,896	0,029	1,121	23,215
	Animais Treinados 2 dias	13,168	2,875	0,018	2,127	24,209
	Animais Treinados 7 dias	11,394	3,007	0,044	0,258	22,529
	Animais Treinados 14 dias	-31,714	5,861	0,002	-52,354	-11,074

Based on observed means. *The mean difference is significant at the 0,5 level

ANEXO C

NORMAS DA REVISTA

THE AMERICAN JOURNAL OF SPORTS MEDICINE

Manuscript Submission Guidelines

The *American Journal of Sports Medicine* is the official publication of the American Orthopaedic Society for Sports Medicine and welcomes submission of original research articles and case reports related to orthopaedic sports medicine. Manuscripts must not be under simultaneous consideration by any other publication, before or during the peer-review process. Papers presented at AOSSM meetings must be submitted to the Journal for first rights of refusal. Authors are responsible for submitting papers of presentations directly to the Journal. Accepted manuscripts become the permanent property of the AOSSM and may not be published elsewhere without written permission from the copyright holder.

Manuscripts should cite any other work by one or more of the co-authors that is relevant to the subject matter of the current submission or that used any of the same subjects, animals, or specimens being reported in the current submission. This includes manuscripts that are currently under preparation, are being considered by journals, are accepted for publication, or already published. In any of these cases, the relationship to the current submission should be made clear. Articles intended for the "Current Concepts" section of the Journal are solicited by the Associate/Current Concepts Editor, Timothy E. Foster, MD (currentconceptsajsm@msn.com). Please do NOT submit articles for this section; a query letter may be written to Dr. Foster regarding possible material or suggestions for this section.

Submissions

Authors should register on our online submission site at <http://ajsm-submit.highwire.org/> to submit manuscripts.

When manuscripts have been received by the editorial office, the corresponding author will be sent an acknowledgment giving an assigned manuscript number, which should be used with all subsequent correspondence for anything related to that particular manuscript.

The following items are required on submission:

1. Blinded manuscript including the abstract and figures legends. No identifying information should appear in the uploaded manuscript. Please remove author names, initials, and institutions.
2. Copyright transfer and Conflict of Interest statements. These forms are available for download from the author area of the website. All authors must sign both forms and return to AJSM by fax or uploaded online as a PDF.
3. What is known about the subject and what this study adds to the existing knowledge. These brief statements will be available to reviewers to place the study in context.

Cover letter, acknowledgments, and suggested reviewers are optional. If a paper has more than 5 authors, a cover letter detailing the contributions of all authors should be included in the appropriate box on the submission page. For multicenter studies, only those involved in writing the paper should be included in the author line (up to 12 authors). Others should be listed as a footnote or acknowledgment.

Manuscript Formats

Manuscript pages should be typed double-spaced with page numbers and lines numbered consecutively. Manuscripts should be 6000 words or fewer (including abstract and references). There are also limitations on figures, tables, and references; see guidelines below. The system handles most common word processing formats; however, Word and PDF are preferred.

Abstract

Abstracts should summarize the contents of the article in 300 words or less. Abstracts longer than 300 words will be edited and the corresponding author will be asked to approve the reduced abstract or to assist in shortening it to the required length. The abstract should be structured in the following format:

Background: In one or two sentences, summarize the scientific body of knowledge surrounding your study and how this led to your investigation.

Hypothesis/Purpose: State the theory(ies) that you are attempting to prove or disprove by your study or the purpose if no hypothesis exist.

Study Design: Identify the overall design of your study. See list below.

Methods: Succinctly summarize the overall methods you used in your investigation. Include the study population, type of intervention, method of data collection, and length of the study.

Results: Report the most important results of your study. Only include positive results that are statistically significant, or important negative results that are supported by adequate power. Report actual data, not just *P* values.

Conclusions: State the answer to your original question or hypothesis. Summarize the most important conclusions that can be directly drawn from your study.

Clinical Relevance: If yours was a laboratory study, describe its relevance to clinical sports medicine.

Key Terms: Provide at least 4 key words for indexing.

Study Designs

Meta-analysis: A systematic overview of studies that pools results of two or more studies to obtain an overall answer to a question or interest. Summarizes quantitatively the evidence regarding a treatment, procedure, or association.

Systematic Review: An article that examines published material on a clearly

described subject in a systematic way. There must be a description of how the evidence on this topic was tracked down, from what sources and with what inclusion and exclusion criteria.

Randomized Controlled Clinical Trial: A group of patients is randomized into an experimental group and a control group. These groups are followed up for the variables / outcomes of interest.

Crossover Study Design: The administration of two or more experimental therapies one after the other in a specified or random order to the same group of patients.

Cohort Study: Involves identification of two groups (cohorts) of patients, one which did receive the exposure of interest, and one which did not, and following these cohorts forward for the outcome of interest.

Case-control Study: A study that involves identifying patients who have the outcome of interest (cases) and patients without the same outcome (controls), and looking back to see if they had the exposure of interest.

Cross-Sectional Study: The observation of a defined population at a single point in time or time interval. Exposure and outcome are determined simultaneously.

Case Series: Describes characteristics of a group of patients with a particular disease or who have undergone a particular procedure. Design may be prospective or retrospective. No control group is used in the study, although the discussion may compare the results to others published in the literature.

Case Report: Similar to the Case Series, except that only one or a small group of cases is reported.

Descriptive Epidemiology Study: Observational study describing the injuries occurring in a particular sport.

Controlled Laboratory Study: An in vitro or in vivo investigation in which one group receiving an experimental treatment is compared to one or more groups receiving no treatment or an alternate treatment.

Descriptive Laboratory Study: An in vivo or in vitro study that describes characteristics such as anatomy, physiology, or kinesiology of a broad range of subjects or a specific group of interest.

Authors should choose the design that best fits the study. The Editor will make the final determination of the study design and level of evidence based on the Center for Evidence Based Medicine guidelines.

Text

In general, follow the standard IMRAD (Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion) format for writing scientific articles. The author is responsible for all statements made in the work, including copy editor changes, which the author will have an opportunity to verify. Papers including human or animal subjects must include a statement of approval by appropriate agencies. The institution should not be mentioned in the blinded manuscript, but should be added on acceptance.

Reports on surgery, except in rare instances, require a minimum follow-up of two years.

Use generic names of drugs or devices. If a particular brand was used in a study, insert the brand name along with the name and location of the manufacturer in parentheses after the generic name when the drug or device is first mentioned in the text.

Use metric units in measurements (that is, centimeter vs inch, kilogram vs pound).

Abbreviations should be used sparingly. When abbreviations are used, give the full term followed by the abbreviation in parentheses the first time it is mentioned in the text, such as femur-ACL-tibia complex (FATC).

Use of a CONSORT flow diagram is recommended to illustrate the grouping and flow of patients in all clinical studies, whether randomized clinical trials or otherwise.

Statistical methods should be described in detail. Actual P values should be used unless less than .001. Reporting of 95% Confidence Intervals is encouraged.

Acknowledgment

Type acknowledgments in the box provided on the submission page. Give credit to sponsors, donors, or grantors; technical assistants; and professional colleagues who contributed to the quality of the paper but are not listed as authors. Please briefly describe the contributions made by persons being acknowledged.

References

References should be typed double-spaced in alphabetical order and numbered according to the alphabetical listing. Except for review articles, references should be limited to 60. If references are not in alphabetical order the uploaded file will be REJECTED and will have to be resubmitted with the references in the correct form. When author entries are the same, alphabetize by the first word of the title. In general, use the Index Medicus form for abbreviating journal titles and the *AMA Manual of Style* for format. Note: references must be retrievable. Do not include in the reference list presentations from meetings that have not been published. Data such as presentations and articles that have been submitted for publication but have not been accepted must be put in the text as unpublished data immediately after mention of the information (for example, "Smith and Jones (unpublished data, 2000) noted. . ."). Personal communications and other references to unpublished data are discouraged.

References will be linked to Medline citations for the reviewers. Authors can include articles that are in Publish-Ahead-of-Print mode. To ensure that the references are linked correctly, please provide the PMID number from Medline at the end of the reference. For example: Emery CA, Meeuwisse WH. Injury Rates, Risk Factors, and Mechanisms of Injury in Minor Hockey. *Am J Sports Med.* 2006 Jul 21; [Epub ahead of print] PMID: 16861577

Figures (Illustrations) and Tables

The number of figures and tables should not exceed 3 journal pages. One journal

page equals 1 large table or figure, 2 medium tables or figures, or 4 small tables or figures. Medium tables and figures will be a page width and half the length of the page, small tables and figures are one column width and take up half the length of the page or less.

Any material that is submitted with an article that has been reproduced in another source (that is, that has been copyrighted previously) must conform to the current copyright regulations. It is the author's responsibility to obtain written permission for reproduction of copyrighted material and for providing the editorial office with that documentation before the material will be reproduced in the Journal.

Be sure to include figure legends in the text or as a separate file. The figure legend should include descriptions of each figure part and identify the meaning of any symbols or arrows. Terms used for labels and in the legend must be consistent with those in the text.

Color will be used in the journal where needed (example, histology slides or surgical photographs). All other figures, such as bar graphs and charts, should be submitted in black and white.

Figures for papers accepted for publication must meet the requirements of the publisher, Sage Publications. Files for line drawings should be created at 1200 dpi, for color photographs at 600 dpi, and for black and white photographs at 300 dpi. You can check the quality of your figures at the Preflight tool for our printer <http://dx.sheridan.com/>.

Charts and graphs can be submitted in the original form created. Photographs or drawing embedded in Word or PowerPoint are not acceptable for publication. Glossy prints can be sent to the journal if you cannot meet the digital art requirements for publication.

All photographs of patients that disclose their identity must be accompanied by a signed photographic release, granting permission for their likeness to be reproduced in the article. If this is not provided, the patient's eyes must be occluded to prevent recognition.

For tables, the system accepts most common word processing formats. Tables should be numbered consecutively, and have a title that describes the content and purpose of the table. Tables should enhance, not duplicate, information in the text.

Video

Videos may be submitted with a manuscript and, if approved by the editor, will be posted online with the article when published. Video is strongly encouraged for manuscripts reporting surgical, examination, or exercise techniques or injury mechanisms. For more information about the format requirements for videos, please review the [Video Format Guide](#). For detailed information pertaining to copyright and permissions requirements, view the [Video Permission](#) and [Fair Use Quick Guide](#). For videos with identifiable subjects, subjects will need to sign the [Audio-Visual Likeness Release](#) form. It is the author's responsibility to submit signed release forms, if necessary, for each video.

Accepted Manuscripts

Once an article is accepted and typeset, authors will be required to carefully read and correct their manuscript proofs that have been copy edited by the publisher. Any extensive changes made by authors on the proofs (except for correction of typographical errors) will be charged to authors at the rate of \$2 a line. Authors are responsible for ordering reprints of their articles; a reprint order form is provided with the page proofs. Completed articles will be published on our website before print publication.

ANEXO D**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**