



**Pontifícia Universidade Católica do Paraná**  
**Escola de Saúde e Biociências**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia**

**ELI LUIS NAMBA**

**IMUNOEXPRESSÃO DA METALOPROTEINASE-1 E DA INTERLEUCINA-6 NO  
PROCESSO DE REPARO DE LESÕES MUSCULARES EM RATOS SUBMETIDOS  
A EXERCÍCIOS FÍSICOS.**

**CURITIBA**  
**2013**

**ELI LUIS NAMBA**

**IMUNOEXPRESSÃO DA METALOPROTEINASE-1 E DA INTERLEUCINA-6 NO  
PROCESSO DE REPARO DE LESÕES MUSCULARES EM RATOS SUBMETIDOS  
A EXERCÍCIOS FÍSICOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Biociências da Escola de Saúde e Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Trindade Grégio.  
Co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Aline Cristina Batista Rodrigues Johann

**CURITIBA  
2013**

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

N174i  
2013

Namba, Eli Luis  
Imunoexpressão da metaloproteinase-1 e da interleucina-6 no processo de reparo de lesões musculares em ratos submetidos a exercícios físicos / Eli Luis Namba; orientadora, Ana Maria Trindade Grégio; co-orientadora, Aline Cristina Batista Rodrigues Johann. – 2013.  
30 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2013.  
Inclui bibliografias

1.Odontologia. 2. Interleucina-6. 3. Inibidor tecidual de metaloproteinase-1  
4. Músculos – Doenças. 5. Inflamação. 6. Exercícios físicos. I. Grégio, Ana Maria Trindade. II. Johann, Aline Cristina Batista Rodrigues. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. V. Título.

CDD 20. ed. – 617.6



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola de Saúde e Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia


## TERMO DE APROVAÇÃO

**ELI LUÍS NAMBA**

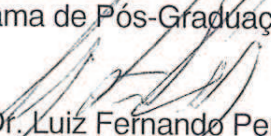
### IMUNOEXPRESSIONÃO DA METALOPROTEINASE-1 E DA INTERLEUCINA-6 NO PROCESSO DE REPARO DE LESÕES MUSCULARES EM RATOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIOS FÍSICOS


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


Orientador (a):

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Trindade Grégio  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aline Cristina Batista Rodrigues Johann  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Prof. Dr. Luiz Fernando Pereira  
Curso de Ciências Biológicas Bacharelado, PUCPR

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Angela Naval Machado  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR

  
Prof. Dr. Ricardo Corrêa da Cunha  
Curso de Educação Física, UP

Curitiba, 11 de dezembro de 2013.

*Dedico este trabalho a Deus, minha esposa e minha família.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À minha orientadora, professora Dra. Ana Maria Trindade Grégio, pelo apoio incondicional ao desafio proposto na realização da pesquisa, muito além de orientar me trouxe com grandeza um exemplo de vida, cujos ensinamentos estão acima dos aprendizados da sala de aula e que os levarei para resto de minha vida.

Ao professor Dr. Edvaldo Rosa, coordenador do programa de Biociências, por acreditar na Odontologia do Esporte a ponto de abrir as portas das disciplinas do doutorado para um novo desafio que não passavam de um sonho e projeto de vida pessoal. A construção se deve a apoio e confiança depositada em nossos trabalhos.

Mas do que especial e aqui deve fazer parte, é meu agradecimento a minha esposa, amiga, Camila companheira de todas as horas que dividiu todos os obstáculos deste trajeto que muitas vezes não dependia de seus esforços, mas que de alguma forma estava ali ao meu lado. Amor maior do mundo que já fez esta vida valer a pena.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço esta conquista àquele que no meu caminho colocou as adversidades necessárias para meu crescimento espiritual, Deus.

Aos meus pais, Katsumi e Ludvina, pelo incentivo constante na minha formação profissional e a família que me fortalece.

À professora Aline Johann pela paciência em seus ensinamentos, cuidado e empenho pelo trabalho desenvolvido.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná e à Universidade Positivo, pela oportunidade de realizar o doutorado, colaborando com meu desenvolvimento profissional.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Neide Reis Borges, pela amizade e pelas boas risadas compartilhadas durante este período.

Às colegas de doutorado e alunos de especialização de Odontologia do Esporte, que participaram efetivamente de um projeto pessoal, que compraram a idéia de escrever um livro que está em etapa final de construção.

Ao meu grande amigo, Daniel Bonotto, que dividiu os bons e maus momentos desta etapa de nossas vidas, com alegria e diversão e um “pouquinho” de trabalho sério também .

Ao professor Sergio Vieira coordenador do programa de pós graduação da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

A todos os funcionários que de forma direta ou indireta fizeram parte de tudo isso, não construímos nada sozinhos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio, pela contribuição na análise estatística dessa pesquisa.

**MUITO OBRIGADO**

“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein



## RESUMO

Lesões musculares fazem parte do dia a dia dos atletas e sua presença impede o praticante de exercer sua atividade. Em um estudo prévio verificou-se que o exercício físico acelerava a deposição inicial de colágeno tipo III, mas retardava o processo de maturação, com menor área de colágeno tipo I em lesões musculares de ratos. A Interleucina-6 (IL-6) e a Metaloproteinase-1 (MMP-1) eram as enzimas envolvidas no processo de reparo. Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi quantificar a imunexpressão da IL-6 e MMP-1 no processo de reparo de lesões musculares de ratos treinados e sedentários. A amostra foi constituída por 64 ratos machos Wistar, que foram divididos em dois grupos: Grupo Experimental (GE) foi submetido a natação e o Grupo Controle (GC) composto por animais sedentários. Foram induzidas lesões no músculo gastrocnêmio por meio da aplicação subcutânea de NaOH a 40%, sendo os animais mortos após 2, 7, 14 e 21 dias. Segmentos teciduais, incluindo a área lesionada, foram removidos e encaminhados para análise histológica. Foi realizada a análise imunistoquímica com os anticorpos anti IL-6 e MMP-1. Na análise estatística foram utilizados os testes Games Howell e ANOVA. Aos 14 dias menor expressão de MMP-1 ( $p=0,01$ ) foi encontrada no GE ( $2434,42\pm 1324,40$ ) comparado com o GC ( $26735,02\pm 10773,28$ ). Aos 21 dias, menor expressão de IL-6 ( $p=0,00$ ) e maior de MMP-1 ( $p=0,05$ ) foram observadas no GE ( $598,08\pm 349,03$ ;  $14586,71\pm 8601,10$  respectivamente) comparado ao GC ( $3915,37\pm 1319,25$ ;  $7273,49\pm 2304,86$  respectivamente). O *stresse* ocasionado pela atividade física da musculatura lesionada diminui a expressão a MMP-1 no estágio inicial do processo de reparo e no estágio mais tardio aumenta a expressão de MMP-1 e diminui a expressão de IL-6, o que pode ter contribuído no estudo prévio com o incremento do colágeno do tipo III em uma fase inicial do processo de reparo e uma menor deposição de colágeno do tipo I em uma fase mais tardia, resultando em menor resistência da ferida. Sugere-se então que os atletas isolem o grupo muscular lesionado durante o treinamento para favorecer o processo de reparo.

**Palavras-chave:** processo de reparo; exercício; inflamação; lesão muscular; metaloproteinase-1; interleucina-6.

## ABSTRACT

Muscle injuries are part of the daily lives of athletes and their presence prevents the practitioner to exert its activity. In a previous study it was found that exercise accelerated the initial deposition of collagen type III, but slowed the ripening process, with smaller areas of type I collagen in muscle injury in rats. Interleukin-6 (IL-6) and metalloproteinase-1(MMP-1) are respectively miocina and enzyme involved in the repair process. Thus, the objective of this research was to quantify the immunoreactivity of IL-6 and MMP-1 in the repair of muscle damage of trained and sedentary rats. The sample consisted of 64 male Wistar rats were divided into two groups: experimental group (EG) was subjected to swimming and Control Group (CG) composed of sedentary animals. Lesions were induced in the gastrocnemius muscle by subcutaneous injection of 40% NaOH , and the animals killed after 2, 7, 14 and 21 days. Tissue segments, including the injured area, were removed and sent for laboratory processing. Immunohistochemical analysis with anti IL-6 and MMP -1 antibodies was performed. In statistical tests performed and Games Howell ANOVA were used. At 14 days lower expression of MMP-1 ( $p = 0,01$ ) was found in EG ( $2434.42 \pm 1324.40$ ) compared to the CG ( $26735.02 \pm 10773.28$ ). At 21 days, lower expression of IL-6 ( $p = 0,00$ ) and higher MMP -1 ( $p=0,05$ ) was observed in EG ( $598.08 \pm 349.03$ ;  $14586.71 \pm 8601.10$  respectively) compared to the CG ( $1319.25 \pm 3915.37$ ;  $7273.49 \pm 2304.86$ , respectively). The stress caused by physical activity of the injured muscles decreases the expression of MMP-1 in the initial stage of the repair process and in the later stage increases the expression of MMP-1 and decreases the expression of IL-6, which may have contributed in previous study with the increase of type III collagen at an early stage of the repair process and less deposition of collagen type I in a later phase, resulting in reduced wound strength. It is suggested that athletes then isolate the injured muscle group during training.

**Keywords:** repair process; exercise; inflammation; muscle injury; metalloproteinase-1; Interleukin-6.

## Sumário

<b>Artigo em português.....</b>	<b>2</b>
<b>Artigo em inglês.....</b>	<b>11</b>
<b>Apêndice A- Material e Métodos.....</b>	<b>19</b>
<b>Anexo A- Comitê de Ética- CEUA PUCPR.....</b>	<b>25</b>
<b>Anexo B- Normas da Revista.....</b>	<b>27</b>

## 1-ARTIGO EM PORTUGUÊS

### **Imunoexpressão da Metaloproteinase-1 e da Interleucina-6 no processo de reparo de lesões musculares em ratos submetidos a exercícios físicos.**

Immunoexpression of metalloproteinase-1 and Interleukin-6 in repair process in muscle lesions in rats submits at the exercise.

Eli Luis Namba<sup>I</sup>, Ana Maria Trindade Grégio<sup>II</sup>, Aline Cristina Batista Rodrigues Johann<sup>III</sup>

<sup>I</sup> Professor adjunto do curso de Odontologia da Universidade Positivo, aluno do doutorado da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>II</sup> Doutora em Farmacologia pela UNICAMP, professora titular do curso de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>III</sup> Doutora em Patologia pela UFMG, professora adjunta do curso de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

---

### **Introdução**

As lesões musculares fazem parte do dia a dia dos atletas de alto rendimento físico e o processo de reparo acaba tornando-se fundamental para o retorno às atividades esportivas.<sup>8</sup> Em muitos casos a recuperação é tão importante que pode definir a participação dos atletas nas competições e, caso não ocorra pode gerar perdas de recursos financeiros.<sup>8,23</sup> As lesões musculares correspondem a um percentual de 10 a 55% de todas as lesões sofridas pelos atletas durante a prática dos esportes.<sup>2</sup>

A recuperação muscular ocorre por duas vias: regeneração da área lesionada ou reparo; o que determina a via de reparo é a extensão da área lesionada.<sup>8,9</sup> Durante o processo de reparo muscular as citocinas inflamatórias são ativadas.<sup>8,20,26</sup> Quando associadas ao músculo esquelético são denominadas de miocinas. A interleucina-6 (IL-6) é a miocina que mais se expressa nos tecidos musculares durante a prática de exercícios físicos.<sup>19,20</sup> A IL-6 é liberada primeiramente pelos macrófagos e linfócitos em resposta a uma injúria.<sup>21</sup> Para Toumi e Best (2006) a IL-6 está envolvida no processo de reparo muscular.<sup>19,27</sup> A IL-6 tem um papel importante na cicatrização da ferida provavelmente por regular a infiltração de leucócitos e aumentar o colágeno.<sup>10</sup> Para que ocorra a degradação do colágeno do tipo III para que possa ser depositado o colágeno do tipo I, que confere maior resistência da ferida, é necessário a presença das metaloproteinases (MMP).<sup>17</sup> As MMPs se apresentam em nosso organismo em número de 20,<sup>17,29</sup> dentre elas a mais presente no processo de reparo, remodelando e degradando o colágeno do tipo III é a MMP-1.<sup>30</sup>

Em um estudo prévio realizado por Namba et al (2014) verificou-se em ratos com úlcera induzida, uma maior expressão de colágeno tipo III aos 14 dias e menor do tipo I aos 21 dias, o que

significa que apesar de ter acelerado a deposição do colágeno em uma fase mais inicial este colágeno apresentou uma menor maturação em um período posterior conferindo menor resistência a ferida.<sup>18</sup> Desta forma a hipótese do estudo é que haveria diminuição na imunexpressão da IL-6 e MMP-1 comparando animais submetidos ao treinamento físico com sedentários. A presença do colágeno do tipo III confere ao processo de reparo uma arquitetura tecidual de menor resistência, neste sentido, sabendo da importância da IL-6 e da MMP-1 neste processo, a proposta desta pesquisa foi quantificar a interação da IL-6 e da MMP-1 no processo de reparo em animais treinados com a presença de uma úlcera em sua musculatura ativa.

## **Métodos**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em uso de animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEUA/PUCPR), sob o número 297/07. A amostra foi constituída por 64 ratos *Wistar*, machos, com idade de 50 dias, com peso entre 250 e 300 gramas. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum* e foi respeitado o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro.

Os animais foram divididos em dois grupos: a) Grupo experimental (GE) 32 animais portadores de lesão muscular e que praticavam previamente atividade física e b) Grupo controle (GC) com 32 animais sedentários portadores de lesão muscular. Dentro de cada grupo os animais foram subdivididos em quatro subgrupos (n=8) de 2, 7, 14 e 21 dias após indução da lesão muscular. O processo de reparo foi avaliado sem nenhuma interferência terapêutica.

Os animais do GE nadaram em um esquema de 5 dias de treino e 2 dias de repouso/semana de acordo com a metodologia descrita por Namba et al (2014). As sessões de natação ocorreram às 8 horas em recipiente de amianto (100cm x 70cm x 60cm) com coluna de água de 40cm a 32°C.

Nos cinco primeiros dias de natação os animais se adaptaram ao ambiente aquático iniciando por 10 minutos, de forma que a cada dia eram acrescidos 10 minutos. A partir do sexto dia de natação acrescentou-se diariamente uma carga equivalente a 5% do peso corporal acoplada ao tórax por meio de um elástico.

No 11º dia de natação realizou-se a lesão muscular e os animais continuaram o treinamento nos 2, 7, 14 e 21 dias seguintes a indução da lesão, ou seja, totalizando 13, 18, 25 e 32 dias de natação respectivamente.

Os animais do GC apesar de não submetidos à natação, foram colocados na água e imediatamente retirados a fim de simular o estímulo neurofisiológico induzido no grupo experimental.

Depois de anestesiados por injeção intraperitoneal de tiopental sódico® 80mg/kg (Cristália, SP, Brasil), foi realizada a indução da lesão no músculo gastrocnêmico direito com 80  $\mu$ L de NaOH 40%, via subcutânea.

Após os 2, 7, 14 e 21 dias supracitados, os animais dos grupos GC e GE foram mortos por meio da injeção com alta dose de solução anestésica por meio da via intraperitoneal (tiopental sódico, 150 mg/Kg). A área lesionada foi removida, fixada em formalina 10% e processada.

A avaliação imunohistoquímica para as proteínas IL-6 e MMP-1 foi feita utilizando cortes histológicos de 4  $\mu\text{m}$  de espessura. Foi realizada a recuperação antigênica, aonde as lâminas foram imersas em recuperador Imuno Retriever (Dako, Carpinteria, CA, EUA,) em uma cuba de banho-maria à 99°C por 30min. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-IL-6 e MMP-1 (monoclonal de camundongo, Immunity Biotechnology, Campinas, São Paulo, Brasil e monoclonal de coelho, clone: EP247Y, marca: millipore, Califórnia EUA), em câmara úmida, a 4°C, overnight. A diluição (em Antibody Diluent with Background-Reducing Components, DAKO Carpinteria, CA, EUA, código S302283) foi de 1:200 e 1:50. O controle positivo utilizado foi a pele inflamada com lesão e a placenta respectivamente. No controle negativo foi obtido omitindo o anticorpo primário. Os cortes foram incubados com Advance link (Dako, Carpinteria, CA, EUA, código K406889) por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida, em seguida incubadas em Advance enzyme (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA, código K406889) por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida. A revelação da reação foi executada com a solução cromógena de 3,3' diaminobenzidina (1:1) (DAB - Sigma Chemical, St. Louis, EUA, código D7679) por 5 minutos. A contra-coloração foi feita com solução de hematoxilina de Harris por 5 minutos.

Foram consideradas imunopositivas as estruturas ou células coradas de marrom. Foram capturadas 5 imagens de cada lâmina através de uma microcâmera Dinolite® AM 423X (AmMo Eletronics Corporation, New Taipei city, Taiwan) acoplada ao microscópio Olympus BX-50 (Olympus, Tóquio, Japão) em magnificação de 400X. As imagens foram analisadas no programa de morfometria Image Pro-Plus 4.5, sendo obtida a área de IL-6 e MMP-1 em  $\mu\text{m}^2$ .

Na análise estatística, na comparação entre as variáveis grupo e tempo utilizou ANOVA seguido do teste paramétrico de Games-Howell para as variâncias heterogêneas. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

## Resultados

Aos 21 dias, a média da área de IL-6 foi significativamente menor no GE quando comparado ao GC, conforme tabela 1.

**TABELA 1:** Média da área de IL-6 (micrometros quadrados) de acordo com a variável tempo nos Grupo Controle (GC) e Grupo Experimental (GE)

Dias	GC	(X±DP)	GE	(X±DP)	GAMES HOWELL
					valor de p
2		3.931,88±1.101,17		2.829,79± 968,38	0,6112
7		1.246,88±557,02		503,49±175,36	0,1792
14		1.026,00±576,36		580,57±134,37	0,6220
21		3.915,37±1.319,25		598,08±349,03	0,0017*

Teste ANOVA a dois critérios, X= média; DP= desvio padrão FONTE: pesquisa 2013.

Uma menor expressão de MMP-1 foi observada no GE aos 14 dias quando comparado ao GC, e o contrário foi observado aos 21 dias (tabela 2).

**TABELA 2:** Média da área de MMP-1 (micrometros quadrados) de acordo com a variável tempo nos Grupo Controle (GC) e Grupo Experimental (GE)

Dias	GC	(X±DP)	GE	(X±DP)	GAMES HOWELL
					valor de p
7		19.983,00±8.150,06		8.113,32±2.207,15	0,15
14		26.735,02±10.773,28		2.434,42±1.324,40	0,01*
21		7.273,49±2.304,86		14.586,71±8.601,10	0,05*

Teste ANOVA a dois critérios: p= 0,0003; X= média; DP= desvio padrão FONTE: pesquisa 2013.

Não foi necessário avaliar a MMP-1 aos 2 dias pois neste período o colágeno do tipo III não teria sido depositado.

## Discussão

Os exercícios físicos quando realizados de forma regular e contínua melhoram a qualidade de vida dos indivíduos facilitando as respostas do processo inflamatório e agindo como redutor de riscos a doenças cardiovasculares, infecções e alterações imunológicas.<sup>4,22,31</sup> No âmbito das competições em esportes de alta *performance* o treinamento é parte fundamental no desenvolvimento dos atletas. As lesões musculares fazem parte de treinamentos inadequados, excesso de treinamentos ou traumas decorrentes das atividades propostas e podem determinar a ausência dos atletas nas competições assim

como o término precoce da carreira atlética.<sup>3,14,24,27</sup> Para estudar as influências do exercício sobre a expressão de IL-6 e MMP-1 e o processo de reparo utilizou-se o método de treinamento descrito por Namba et al.(2014), onde se submeteu os ratos da linhagem Wistar à natação e após adequação dos mesmos foi induzida uma lesão ulcerada no músculo gastrocnêmio.<sup>18</sup>

Considerando que a atividade física pode interferir positivamente no processo de reparo o que apesar das lesões musculares serem frequentes entre os atletas e influencie no rendimento dos mesmos, somente um estudo prévio (Namba et al, 2014) revelou a influencia do exercício físico em uma cadeia muscular lesionada, verificando um atraso na deposição do colágeno tipo I resultando em uma menor resistência da ferida. Entretanto este estudo não verificou possíveis fatores que poderiam influenciar neste resultado. Neste o sentido destaca-se o pioneirismo desse estudo, auxiliando o preenchimento de uma lacuna na literatura. Desta forma verificou-se que o exercício físico em uma cadeia muscular lesionada acarreta: 1) redução da expressão da IL-6 aos 21 dias e 2) redução da expressão da MMP-1 aos 14 dias e aumento aos 21 dias.

Citocinas estão presentes nas etapas ativas do processo de cicatrização.<sup>5,6,11</sup> A atividade física moderada altera a resposta inflamatória<sup>22</sup> e proporciona um efeito benéfico sobre a liberação de citocinas<sup>1,18,31</sup> As citocinas fazem parte da etapa proliferativa do reparo, pois atua no recrutamento de fibroblastos que são células responsáveis pela síntese de colágeno.<sup>5,26,32</sup> O estudo realizado apresentou uma menor expressão de IL-6 no GE aos 21 dias. Sugere-se que as alterações que afetaram a expressão de IL-6 no GE esteja relacionada a injúria muscular presente, agravando o estresse da atividade física. Os exercícios físicos realizados de forma regular aumentam a expressão de IL-6<sup>7,12,16,19</sup> como avaliaram Mathur e Pedersen (2008) em biopsias de músculo esquelético.<sup>15</sup> Os resultados encontrados diferem destes autores, pois os animais do GC apresentaram uma maior expressão de IL-6 quando comparados ao GE. Sugere-se que o resultado da pesquisa não corrobora com a literatura e que isto ocorra pela diferença da metodologia, pois a presença da lesão muscular (úlceras) associada a atividade física não foi interrompida mesmo após indução da injúria, além da musculatura ativa no treinamento não passar por um período de repouso após a formação da lesão. Sendo assim a manutenção do exercício na musculatura ativa promove uma menor expressão de IL-6 desfavorecendo o processo de reparo. Novos estudos poderiam avaliar a expressão desta citocina em outra musculatura ulcerada que não participasse de forma ativa do treinamento.

Como demonstrado nos resultados verificamos que a diminuição da expressão de MMP-1 no grupo treinado pode ter um aumento na expressão de colágeno tipo III aos 14 dias verificado em estudo prévio. Dos 14 para os 21 dias, observou-se uma redução considerável do colágeno tipo III, e isso é compatível com o aumento da MMP-1 expressa no grupo treinado neste mesmo período de 21 dias, uma vez que a MMP-1 degrada mais seletivamente o colágeno do tipo III.<sup>25</sup> Possivelmente se os animais



fossem acompanhados por 28 dias a quantidade de colágeno tipo III se equivaleria nos grupos sedentário e treinado. Posteriores estudos devem ser realizados para comprovar esta hipótese.

Esta resposta parece ser padrão em alguns estudos relacionando atividade física aguda com as MMP-1.<sup>10,13</sup> Um estudo realizado por Ulrich (2004), verificou que a expressão de MMP-1, avaliada por imunohistoquímica, aumentou após o exercício físico agudo de alta intensidade.<sup>28</sup> Cappelli et al (2009) também verificaram em seu estudo que a MMP-1 aumenta logo após o exercício físico agudo, neste caso, uma corrida de cavalos, retornando próximo aos níveis basais 24 horas após o exercício.<sup>2</sup> Porém neste estudo não foi utilizada a técnica de imunohistoquímica, e sim PCR que avalia apenas os genes da proteína e não a proteína já expressa como na imunohistoquímica.

Em nosso estudo de resposta crônica foi verificado que a MMP-1 reduziu, colaborando com a pesquisa de Li et al (2009), que avaliou via PCR a MMP-1 crônica em ratos treinados. Mammi et al (2011) avaliaram via ELISA a MMP-1 em seres humanos que realizaram exercício físico em cicloergômetro utilizando de 60 a 80% da frequência cardíaca máxima por três semanas, e verificaram que a MMP-1 também foi reduzida no grupo treinado. Talvez ao longo do tempo o aumento agudo da MMP-1 após o exercício poderia levar a uma diminuição da MMP-1 crônica, devido a uma possível adaptação do organismo a atividade física constante.

Uma hipótese explicando a redução das MMP-1 com o exercício pode ser sua relação com o cálcio, pois as metaloproteinases são endopeptidases cálcio dependente contendo zinco, e as fibras musculares também necessitam de cálcio para que ocorra a interação entre actina e miosina (proteínas contráteis), gerando a contração, portanto o cálcio poderia competir entre os dois locais, atrasando a expressão de MMP-1.<sup>2</sup>

Outro aspecto que pode estar relacionado e merece atenção é a intensidade da atividade física. Será que a intensidade pode ser um fator modulador das metaloproteinases? Posteriores estudos comparando resposta aguda e crônica do exercício, além de diferentes intensidades, poderiam elucidar esta hipótese.

## **Conclusão**

Sugere-se que o *stresse* gerado pela atividade física da musculatura lesionada diminui a expressão da MMP-1 no estágio inicial do processo de reparo e aumenta no estágio tardio e que diminui a expressão da IL-6 no grupo experimental o que pode ter contribuído no estudo prévio com o incremento do colágeno do tipo III na fase inicial do processo de reparo e uma menor deposição de colágeno do tipo I em uma fase mais tardia, resultando em menor resistência da ferida. Sugere-se então que os atletas isolem o grupo muscular lesionado durante o treinamento para não interferir na remodelação da arquitetura tecidual.

## Referências

1. Andersen MB, Pingel J, Kjær M, Langberg H. Interleukin-6: a growth factor stimulating collagen synthesis in human tendon. *J. Appl. Physiol.* 2011;110(6):1549-54. doi:10.1152/jappphysiol.00037.2010.
2. Cappelli K, Felicetti M, Capomaccio S, Pieramati C, Silvestrelli M, Verini-Supplizi A. Exercise-induced up-regulation of MMP-1 and IL-8 genes in endurance horses. *BMC Physiol.* 2009;9:12. doi:10.1186/1472-6793-9-12.
3. Cooper DM, Radom-Aizik S, Schwindt C, Zaldivar F. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. *J. Appl. Physiol.* 2007;103(2):700-9. doi:10.1152/jappphysiol.00225.2007.
4. Febbraio M a. Exercise and inflammation. *J. Appl. Physiol.* 2007;103(1):376-7. doi:10.1152/jappphysiol.00414.2007.
5. Fonseca JE, Santos MJ, Canhão H, Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun. Rev.* 2009;8(7):538-42. doi:10.1016/j.autrev.2009.01.012.
6. Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM, et al. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *FASEB J.* 2000;14(15):2525-31. doi:10.1096/fj.00-0073com.
7. Gallucci RM, Sugawara T, Yucesoy B, et al. Interleukin-6 treatment augments cutaneous wound healing in immunosuppressed mice. *J. Interferon Cytokine Res.* 2001;21(8):603-9. doi:10.1089/10799900152547867.
8. Järvinen T a H, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am. J. Sports Med.* 2005;33(5):745-64. doi:10.1177/0363546505274714.
9. Johnny H, Yong L, Freddie H. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J. Bone Jt. Surg.* 2002;84-A(5):822-32. Available at: <http://www.jbjs.org/cgi/content/full/84/5/822>. Accessed May 5, 2012.
10. Li H, Zhang Y, Ma J. Effects of yiqi huoxue compound combined with exercise therapy on MMP-1 and collagen type III expressions of cardiac muscle in chronic heart failure rats. *Chinese J. Integr. Tradit. West. Med.* 2011;31(7):955-60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21866669>. Accessed November 22, 2013.
11. Lin Z, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. 2003;73(June). doi:10.1189/jlb.0802397.Journal.
12. Lukaszuk B, Bialuk I, Górski J, Zajączkiewicz M, Winnicka MM, Chabowski a. A single bout of exercise increases the expression of glucose but not fatty acid transporters in skeletal muscle of IL-6 KO mice. *Lipids* 2012;47(8):763-72. doi:10.1007/s11745-012-3678-x.

13. Mammi C, la Sala A, Volterrani M, et al. Exercise training reduces serum capacity to induce endothelial cell death in patients with chronic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2011;13(6):642-50. doi:10.1093/eurjhf/hfr026.
14. Martín-Cordero L, García JJ, Hinchado MD, Ortega E. The interleukin-6 and noradrenaline mediated inflammation-stress feedback mechanism is dysregulated in metabolic syndrome: effect of exercise. *Cardiovasc. Diabetol.* 2011;10(1):42. doi:10.1186/1475-2840-10-42.
15. Mathur N, Pedersen BK. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:109502. doi:10.1155/2008/109502.
16. McFarland-Mancini MM, Funk HM, Paluch AM, et al. Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. *J. Immunol.* 2010;184(12):7219-28. doi:10.4049/jimmunol.0901929.
17. McLennan S, Min D, Yue D. Matrix metalloproteinases and their roles in poor wound healing in diabetes. *Wound Pract. Res.* 2008;16(3):116-121.
18. Namba EL, Nawick TO, Thome MJ, et al. Effect of Physical Activity on the Lesion Repair Process in the Gastrocnemius Muscle of Rats. *Open Inflamm. J.* 2014;7(1):1-5. doi:10.2174/1875041901407010001.
19. Pedersen BK, Steensberg a, Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J. Physiol.* 2001;536(Pt 2):329-37. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2278876&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
20. Pedersen BK, Steensberg A, Keller P, et al. Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Arch.* 2003;446(1):9-16. doi:10.1007/s00424-002-0981-z.
21. Pedersen BK, Toft AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sport. Med* 2000;34:246-251. doi:10.1136/bjism.34.4.246.
22. Pedersen L, Pilegaard H, Hansen J, et al. Exercise-induced liver chemokine CXCL-1 expression is linked to muscle-derived interleukin-6 expression. *J. Physiol.* 2011;589(Pt 6):1409-20. doi:10.1113/jphysiol.2010.200733.
23. Robson-Ansley P, Barwood M, Canavan J, et al. The effect of repeated endurance exercise on IL-6 and sIL-6R and their relationship with sensations of fatigue at rest. *Cytokine* 2009;45(2):111-6. doi:10.1016/j.cyto.2008.11.006.
24. Robson-Ansley PJ, Blannin A, Gleeson M. Elevated plasma interleukin-6 levels in trained male triathletes following an acute period of intense interval training. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2007;99(4):353-60. doi:10.1007/s00421-006-0354-y.
25. Saarialho-Kere UK. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch. Dermatol. Res.* 1998;290 Suppl:S47-54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9710383>. Accessed November 22, 2013.

26. Stein B, Kung Sutherland MS. IL-6 as a drug discovery target. *Drug Discov. Today* 1998;3(5):202-213. doi:10.1016/S1359-6446(97)01164-1.
27. Toumi H, F'guyer S, Best TM. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J. Anat.* 2006;208(4):459-70. doi:10.1111/j.1469-7580.2006.00543.x.
28. Ulrich D, Lichtenegger F, Eblenkamp M, Repper D, Pallua N. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, aminoterminal propeptide of procollagen type III, and hyaluronan in sera and tissue of patients with capsular contracture after augmentation with Trilucent breast implants. *Plast. Reconstr. Surg.* 2004;114(1):229-36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220598>. Accessed October 22, 2013.
29. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg. Med. Chem.* 2007;15(6):2223-68. doi:10.1016/j.bmc.2007.01.011.
30. Warhonowicz M, Staszuk C, Gasse H. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinase-1 in the periodontal ligament of equine cheek teeth. *Tissue Cell* 2007;39(6):369-76. doi:10.1016/j.tice.2007.07.005.
31. Yamin C, Duarte JAR, Oliveira JMF, et al. IL6 (-174) and TNFA (-308) promoter polymorphisms are associated with systemic creatine kinase response to eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2008;104(3):579-86. doi:10.1007/s00421-008-0728-4.
32. Yu H, Clarke MCH, Figg N, Littlewood TD, Bennett MR. Smooth muscle cell apoptosis promotes vessel remodeling and repair via activation of cell migration, proliferation, and collagen synthesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(11):2402-9. doi:10.1161/ATVBAHA.111.235622.

## 2-ARTIGO EM INGLÊS

### **Immunoexpression of metalloproteinase-1 and Interleukin-6 in repair process in muscle lesions in rats submits of the exercise.**

#### **Introduction**

Muscle injuries are part of the daily lives of athletes of high physical performance and the repair process ends up becoming crucial for returning to sports activities.<sup>8</sup> In many cases recovery is so important that can define the participation of athletes in sports competitions and even generate losses of resources.<sup>8, 23</sup> The muscle lesions correspond to a percentage 10-55 % of all injuries suffered by athletes during sports practice.<sup>2</sup>

The muscle recovery occurs by two pathways: the regeneration of the injured area or fibrosis , which determines the repair pathway is the extension of the area lesionada.<sup>8, 9</sup> during the repair process of muscle inflammatory cytokines are activities.<sup>8 , 20, 26</sup> Coupled skeletal muscle are called myokines . Interleukin-6 (IL-6) is the most myokines expressed in muscle tissue during exercise practice.<sup>19 , 20</sup> IL- 6 is primarily released by macrophages and lymphocytes in response to a injúria.<sup>21</sup> To Toumi and Best (2006) IL- 6 is involved in the repair process.<sup>19 , 27</sup>For the degradation of collagen type III for it to be deposited type I collagen which gives greater wound strength occur it is necessary the presence of matrix metalloproteinases (MMP) .<sup>17</sup> MMPs present in our body in number of 20,<sup>17, 29</sup> among them more present in the process of repair , remodeling and degrading collagen III is typical MMP- 1.<sup>30</sup>

In a previous study by Namba (2013) was found in rats with induced ulcers, increased expression of collagen type III at 14 days and less type I at 21 days, which means that despite the rapid deposition of collagen in a earlier stage this tissue showed a lower maturation at a later period giving less resistance the wound . Thus the hypothesis of the study is that there would be changes in the immunoreactivity of IL-6 and MMP-1 compare animals undergoing physical training in sedentary. The presence of collagen type III gives the repair process over tissue architecture of least resistance, in this sense, knowing the importance of IL-6 and MMP-1 in this process, the purpose of this research was to investigate the interaction of IL-6 and MMP-1 in the repair process in trained with the presence of an ulcer in their respectively myokine active muscles and the enzymes involved in the repair process animals .

#### **Methods**

This study was approved by the Ethics in Research use of animals at the Pontifical Catholic University of Paraná (CEUA/PUCPR) under number 297 / 07 . The sample consisted of 64 male Wistar rats , aged 50 days, weighing between 250 and 300 grams . The animals were fed food and water ad libitum and the photoperiod of 12 hours light and 12 hours darkness was respected.

The animals were divided into two groups: a) Experimental Group (EG) 32 animals with muscle damage and previously practiced physical activity b) Control Group (CG) with 32 sedentary animals suffering from muscle injury. Within each group, the animals were divided into four subgroups (n=8) for 2, 7, 14 and 21 days after induction of muscle injury. The repair process was evaluated without any therapeutic interference. GE animals swam in a scheme of 5 training days and 2 rest days/week according to the methodology described by Namba et. al. (2013). The swimming sessions occurred at 8 o'clock in asbestos container (100cm x 70cm x 60cm) with 40cm of water column at 32°C.

In the first five days of swimming animals have adapted to the aquatic environment starting for 10 minutes so that each day were added 10 minutes. From the sixth day of swimming was added a daily amount equivalent to 5 % of the thorax coupled through an elastic body weight load.

On day 11 ° swimming held muscle injury, and the animals to be trained within 2, 7, 14 and 21 days of induction of injury, ie a total of 13, 18, 25 and 32 days of swimming respectively. GE animals despite not undergoing swimming, were placed in the water and immediately removed in order to simulate the neurophysiological stimulation induced in the experimental group.

After anesthetized by intraperitoneal injection of sodium thiopental 80mg/kg ® (Cristália, SP, Brazil), the injury in the right gastrocnemius muscle was performed with 80 µL of 40 % NaOH, subcutaneously.

After 2, 7, 14 and 21 above, the animals of CG and GE were killed by injecting a high dose of anesthetic solution through intraperitoneal (thiopental sodium, 150mg/Kg) The injured area was removed, fixed in 10% formalin and processed.

Immunohistochemical evaluation for IL-6 and MMP-1 protein was performed using histological sections of 4 mm thick, antigen retrieval was performed, where the slides were immersed in stove Immunoassay Retriever (Dako, Carpinteria, CA, USA) in a tub of bath at 99 ° C for 30min. Os sections were incubated with the primary antibodies anti - IL-6 and MMP-1 (mouse monoclonal, Immunity Biotechnology, Campinas, São Paulo, Brazil and rabbit monoclonal, clone: EP247Y mark: millipore, California USA) in a moist chamber at 4 ° C overnight. Dilution (in Antibody Diluent with Background-Reducing Components, DAKO Carpinteria, CA, USA, code S302283) from 1:200 to 1:50. The positive control used was inflamed skin lesion and placenta. The negative control was obtained by omitting the primary antibody. The sections were incubated with Advance link (Dako, Carpinteria, CA, USA, code K406889) for 30 minutes at room temperature in a moist, dry and incubated Advance chamber enzyme (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA, code K406889) 30 minutes at room temperature in a humid chamber. The development reaction was performed with the chromogen solution of 3,3'-diaminobenzidine (1:1) (DAB - Sigma Chemical, St. Louis, USA, code D7679) for 5 minutes. Counter-staining was performed with Harris hematoxylin solution for 5 minutes.

Immunopositive structures or brown stained cells were considered, 5 images of each slide were captured through a micro Dino-Lite ® 423X AM (AmMo Electronics Corporation, New Taipei city, Taiwan) coupled to an Olympus BX - 50 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) at a magnification of

400X . The images were analyzed in the morphology Image Pro Plus 4.5 software, the area of IL-6 and MMP-1 is obtained in  $\mu\text{m}^2$ .

In the statistical analysis, the comparison between the group and time variables used parametric ANOVA followed by Games-Howell test for heterogeneous variances.

## Results

At 21 days, the average area of IL-6 was significantly higher in CG compared to EG ( $p = 0.017$ ) as shown in Table 1.

TABLE 1: Average area of IL-6 (square micrometers) according to the time variable in the control group (CG) and Experimental Group (EG)

Days	CG	(X $\pm$ DP)	EG	(X $\pm$ DP)	p
2	3.931,88	$\pm 1.101,17$	2.829,79	$\pm 968,38$	0,6112
7	1.246,88	$\pm 557,02$	503,49	$\pm 175,36$	0,1792
14	1.026,00	$\pm 576,36$	580,57	$\pm 134,37$	0,6220
21	3.915,37	$\pm 1.319,25$	598,08	$\pm 349,03$	0,0017*

Test GAMES HOWELL: X = mean, SD = standard deviation SOURCE: Research 2013.

A lower expression of MMP-1 was observed at 14 days in EG compared to the CG, and the opposite was observed at 21 days (Table 2).

TABLE 2: Average area of MMP-1 (square micrometers) according to the time variable in the control group (CG) and Experimental Group (EG)

Days	CG	(X $\pm$ DP)	EG	(X $\pm$ DP)	p
7	19.983,00	$\pm 8.150,06$	8.113,32	$\pm 2.207,15$	0,15
14	26.735,02	$\pm 10.773,28$	2.434,42	$\pm 1.324,40$	0,01*
21	7.273,49	$\pm 2.304,86$	14.586,71	$\pm 8.601,10$	0,05*

Test ANOVA:  $p = 0.0003$ , X = mean, SD = standard deviation SOURCE: Research 2013.

It was necessary to evaluate the MMP-1 to 2 days for this period collagen type III would not have been deposited much less degraded.

## Discussion

The physical exercises when performed regularly and continuously improve the quality of life of individuals facilitating the responses of the inflammatory process and acting as reducing the risks of cardiovascular diseases , infections and changes inmunológicas.<sup>4 , 22,31</sup> In the context of competitions in sports high performance training is a fundamental part in the development of athletes . Muscle injuries

are part of inadequate training, excessive training or trauma resulting from the proposed activities and may determine the absence of athletes in competition or an early termination of athletic career,<sup>3,14,24,27</sup> To study the influence of exercise on the expression of IL-6 and MMP-1 and the repair process, we used the method of Namba et al training. (2013), where he underwent the Wistar rats to swimming after adjustment thereof was induced an ulcerated lesion gastrocnemius muscle.<sup>18</sup>

Whereas physical activity can positively affect the repair process, despite muscle injuries are common among athletes influence on the yield of these only one previous study (Namba et al, 2013) showed the influence of physical exercise on an injured muscle group, checking a delay in collagen deposition type I resulting in a smaller wound strength. This study did not examine the possible factors that could influence this result. In this sense it is worth mentioning the pioneering of this study, helping fill a gap in the literature. Thus it was found that the exercise in an injured muscle group causes: 1) reduced expression of IL-6 on day 21 and 2) decreased expression of MMP-1 after 14 days and an increase after 21 days.

Factors such as the presence of cytokines are present in the active stages of processo.<sup>5, 6,11</sup> Moderate physical activity alters the response inflamatória<sup>22</sup> and provides a beneficial effect on the release of cytokines.<sup>1, 18,31</sup> Cytokines are part of the proliferative phase repair, as it acts in the recruitment of fibroblasts that are responsible for the synthesis of colágeno.<sup>5, 26,32</sup> The study cells showed increased expression of IL-6 in CG at all times evaluated, being significant at 21 days. It is suggested that the alterations affecting the expression of IL-6 in EG is related to muscle injury present, exacerbating the stress of physical activity. Physical exercises performed regularly increase the expression of IL-6 as assessed<sup>7,12,16,19</sup> Pedersen and Mathur (2008) in muscle biopsies.<sup>15</sup> The results differ from these authors, because the animals showed a CG increased expression of IL-6 when compared to EG. It is suggested that the search result does not corroborate with the literature for the presence of muscle damage (ulcer) be associated with physical activity that was not interrupted even after induction of injury, besides the active muscles in training did not go through a period of rest after lesion formation. Thus the maintenance of exercise in active muscles promotes a lower expression of IL-6 disadvantaging the repair process. Further studies could evaluate the expression of this cytokine in other muscles that do not participate actively in the training.

As shown in the results verified that the decreased expression of MMP-1 in the trained group generated an increase in the expression of type III collagen at 14 days. From 14 to 21 days, there was a significant reduction in collagen type III, and that is compatible with the increase of MMP-1 expressed in trained in the same 21 day period group, since MMP-1 selectively degrades more collagen type III.<sup>25</sup> Possibly if animals were monitored for 28 days the amount of type III collagen amount in sedentary and exercise groups. Further studies should be conducted to confirm this hypothesis.



This response seems to be standard in some studies linking chronic physical activity with MMP-1.<sup>10,13</sup> A study by Ulrich (2004) found that the expression of MMP-1, as assessed by immunohistochemistry, increased after acute exercise of high intensity.<sup>28</sup> Cappelli et al (2009) also found in their study that MMP-1 increases after acute exercise, in this case, a horse race, returning close to baseline levels 24 hours after exercício.<sup>2</sup> However this study did not use the immunohistochemical technique to evaluate PCR, but only the genes and the protein no longer expressed as protein in immunohistochemistry.

In our study of chronic response was observed that MMP-1 reduced, collaborating with research by Li et al (2009) evaluated via PCR chronic MMP-1 in trained rats. Mammi et al (2011) assessed via ELISA MMP-1 in humans who underwent exercise on a cycle ergometer using 60-80 % of maximum heart rate for three weeks, and found that MMP-1 was also reduced in the trained group. Perhaps over time the sharp increase of MMP-1 after exercise could lead to a decrease (inhibition) of chronic MMP-1, due to a possible adaptation of the organism to constant physical activity.

One hypothesis explaining the reduction of MMP-1 with exercise may be its relationship with calcium because endopeptidases dependent metalloproteinases are zinc-containing calcium, and the muscle fibers also require calcium for the interaction to occur between actin and myosin (contractile proteins), causing contraction, so calcium could compete between the two locations, delaying the expression of MMP-1.<sup>2</sup>

Another aspect that may be related and deserves attention is the intensity of physical activity. Does the intensity modulator can be a factor of metalloproteinases? Subsequent studies comparing acute and chronic exercise response, and different intensities, could elucidate this hypothesis.

## **Conclusion**

It is suggested that the stress generated by physical activity of the injured muscles decreases the expression of MMP-1 in the initial stage of the repair process and increases in late stage. The lower expression of IL-6 in the experimental group may have contributed in a previous study with the increase of collagen type III in the early phase of the repair process and less deposition of collagen type I in a later phase, resulting in less resistance the wound. It is suggested that athletes then isolate the injured muscle group during training not to interfere with the remodeling of tissue architecture.

## References

1. Andersen MB, Pingel J, Kjær M, Langberg H. Interleukin-6: a growth factor stimulating collagen synthesis in human tendon. *J. Appl. Physiol.* 2011;110(6):1549-54. doi:10.1152/jappphysiol.00037.2010.
2. Cappelli K, Felicetti M, Capomaccio S, Pieramati C, Silvestrelli M, Verini-Supplizi A. Exercise-induced up-regulation of MMP-1 and IL-8 genes in endurance horses. *BMC Physiol.* 2009;9:12. doi:10.1186/1472-6793-9-12.
3. Cooper DM, Radom-Aizik S, Schwindt C, Zaldivar F. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. *J. Appl. Physiol.* 2007;103(2):700-9. doi:10.1152/jappphysiol.00225.2007.
4. Febbraio M a. Exercise and inflammation. *J. Appl. Physiol.* 2007;103(1):376-7. doi:10.1152/jappphysiol.00414.2007.
5. Fonseca JE, Santos MJ, Canhão H, Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun. Rev.* 2009;8(7):538-42. doi:10.1016/j.autrev.2009.01.012.
6. Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM, et al. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *FASEB J.* 2000;14(15):2525-31. doi:10.1096/fj.00-0073com.
7. Gallucci RM, Sugawara T, Yucesoy B, et al. Interleukin-6 treatment augments cutaneous wound healing in immunosuppressed mice. *J. Interferon Cytokine Res.* 2001;21(8):603-9. doi:10.1089/10799900152547867.
8. Järvinen T a H, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am. J. Sports Med.* 2005;33(5):745-64. doi:10.1177/0363546505274714.
9. Johnny H, Yong L, Freddie H. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J. Bone Jt. Surg.* 2002;84-A(5):822-32. Available at: <http://www.jbjs.org/cgi/content/full/84/5/822>. Accessed May 5, 2012.
10. Li H, Zhang Y, Ma J. Effects of yiqi huoxue compound combined with exercise therapy on MMP-1 and collagen type III expressions of cardiac muscle in chronic heart failure rats. *Chinese J. Integr. Tradit. West. Med.* 2011;31(7):955-60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21866669>. Accessed November 22, 2013.
11. Lin Z, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. 2003;73(June). doi:10.1189/jlb.0802397.Journal.
12. Lukaszuk B, Bialuk I, Górski J, Zajączkiewicz M, Winnicka MM, Chabowski a. A single bout of exercise increases the expression of glucose but not fatty acid transporters in skeletal muscle of IL-6 KO mice. *Lipids* 2012;47(8):763-72. doi:10.1007/s11745-012-3678-x.

13. Mammi C, la Sala A, Volterrani M, et al. Exercise training reduces serum capacity to induce endothelial cell death in patients with chronic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2011;13(6):642-50. doi:10.1093/eurjhf/hfr026.
14. Martín-Cordero L, García JJ, Hinchado MD, Ortega E. The interleukin-6 and noradrenaline mediated inflammation-stress feedback mechanism is dysregulated in metabolic syndrome: effect of exercise. *Cardiovasc. Diabetol.* 2011;10(1):42. doi:10.1186/1475-2840-10-42.
15. Mathur N, Pedersen BK. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:109502. doi:10.1155/2008/109502.
16. McFarland-Mancini MM, Funk HM, Paluch AM, et al. Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. *J. Immunol.* 2010;184(12):7219-28. doi:10.4049/jimmunol.0901929.
17. McLennan S, Min D, Yue D. Matrix metalloproteinases and their roles in poor wound healing in diabetes. *Wound Pract. Res.* 2008;16(3):116-121.
18. Namba EL, Nawick TO, Thome MJ, et al. Effect of Physical Activity on the Lesion Repair Process in the Gastrocnemius Muscle of Rats. *Open Inflamm. J.* 2014;7(1):1-5. doi:10.2174/1875041901407010001.
19. Pedersen BK, Steensberg a, Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J. Physiol.* 2001;536(Pt 2):329-37. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2278876&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
20. Pedersen BK, Steensberg A, Keller P, et al. Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Arch.* 2003;446(1):9-16. doi:10.1007/s00424-002-0981-z.
21. Pedersen BK, Toft AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sport. Med* 2000;34:246-251. doi:10.1136/bjism.34.4.246.
22. Pedersen L, Pilegaard H, Hansen J, et al. Exercise-induced liver chemokine CXCL-1 expression is linked to muscle-derived interleukin-6 expression. *J. Physiol.* 2011;589(Pt 6):1409-20. doi:10.1113/jphysiol.2010.200733.
23. Robson-Ansley P, Barwood M, Canavan J, et al. The effect of repeated endurance exercise on IL-6 and sIL-6R and their relationship with sensations of fatigue at rest. *Cytokine* 2009;45(2):111-6. doi:10.1016/j.cyto.2008.11.006.
24. Robson-Ansley PJ, Blannin A, Gleeson M. Elevated plasma interleukin-6 levels in trained male triathletes following an acute period of intense interval training. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2007;99(4):353-60. doi:10.1007/s00421-006-0354-y.
25. Saarialho-Kere UK. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch. Dermatol. Res.* 1998;290 Suppl:S47-54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9710383>. Accessed November 22, 2013.

26. Stein B, Kung Sutherland MS. IL-6 as a drug discovery target. *Drug Discov. Today* 1998;3(5):202-213. doi:10.1016/S1359-6446(97)01164-1.
27. Toumi H, F'guyer S, Best TM. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J. Anat.* 2006;208(4):459-70. doi:10.1111/j.1469-7580.2006.00543.x.
28. Ulrich D, Lichtenegger F, Eblenkamp M, Repper D, Pallua N. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, aminoterminal propeptide of procollagen type III, and hyaluronan in sera and tissue of patients with capsular contracture after augmentation with Trilucent breast implants. *Plast. Reconstr. Surg.* 2004;114(1):229-36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220598>. Accessed October 22, 2013.
29. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg. Med. Chem.* 2007;15(6):2223-68. doi:10.1016/j.bmc.2007.01.011.
30. Warhonowicz M, Staszuk C, Gasse H. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinase-1 in the periodontal ligament of equine cheek teeth. *Tissue Cell* 2007;39(6):369-76. doi:10.1016/j.tice.2007.07.005.
31. Yamin C, Duarte JAR, Oliveira JMF, et al. IL6 (-174) and TNFA (-308) promoter polymorphisms are associated with systemic creatine kinase response to eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2008;104(3):579-86. doi:10.1007/s00421-008-0728-4.
32. Yu H, Clarke MCH, Figg N, Littlewood TD, Bennett MR. Smooth muscle cell apoptosis promotes vessel remodeling and repair via activation of cell migration, proliferation, and collagen synthesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(11):2402-9. doi:10.1161/ATVBAHA.111.235622.

## **APÊNDICE A – MATERIAL 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.<sup>4</sup> 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 sulfito de hidrogênio) resultantes da degradação oxidativas e bacteriana dos excrementos, oferecendo assim, condições favoráveis de higiene, conforto e bem-estar.<sup>1</sup>

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.<sup>5</sup> 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**

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.<sup>3</sup> 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 GE 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  $25^\circ \text{C}$ .

## GRUPO CONTROLE

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 ( $\mu\text{m}$ ) 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.

## **ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA**

A avaliação do marcador imunohistoquímico da interleucina-6 foram realizadas no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR. A partir de blocos de parafina foram obtidos cortes histológicos de 4  $\mu\text{m}$  de espessura que foram estendidos sobre lâminas carregadas eletricamente (Lâminas - AutoWrite® Green Adhesion Slides Cut Edges , Sacura, código 9546-1). . As laminas foram secas a 60°C por 24hrs. A desparafinização foi feita com xilol em temperatura ambiente (2 banhos de 10 min). Em seguida, os cortes foram hidratados em álcool etílico absoluto (3 banhos de 1 min) e álcool etílico 80% (1 banho de 1min). A fim de



inibir a peroxidase endógena, os cortes foram incubados em solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% e lavados em água destilada. Depois foi realizada a recuperação antigênica, aonde as lâminas foram imersas em recuperador Imuno Retrifer (Dako, Carpinteria, CA, EUA,) em uma cuba de banho-maria à 99°C por 30min, deixando esfriar à temperatura ambiente. Foi então novamente lavado em água destilada. Em seguida as lâminas foram marcadas com a caneta hidrofóbica Dako pen (Dako, Carpinteria, CA, EUA, Código S2002), delimitando a área do corte.

Os cortes permaneceram imersos em tampão TBS tris @ pH 7.3 até o momento da incubação do anticorpo primário para evitar a secagem do corte. Os cortes foram secos e incubados com o anticorpo primário anti-IL-6(monoclonal de camundongo, Imuny Biotechnology, Campinas, São Paulo, Brasil), em câmara úmida, a 4°C, overnight. A diluição do anticorpo (em Antibody Diluent with Background-Reducing Components, DAKO Carpinteria, CA, EUA, código S302283) foi de 1:200 O controle positivo utilizado foi a pele com lesão. O controle negativo foi obtido omitindo o anticorpo primário. Após a incubação, os cortes foram incubados em tampão TBS tris pH 7.3, sendo mantido no tampão por 15 min. Em seguida os cortes foram lavados novamente em tampão, as lâminas foram secas, e incubadas com Advance link (Dako, Carpinteria, CA, EUA, código K406889) por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida. As lâminas foram lavadas tampão TBS tris pH 7.3 e em seguida secas e incubadas em Advance enzyme (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA, código K406889) por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida os cortes foram lavados em tampão TBS tris pH 7.3. A revelação da reação foi executada com a solução cromógena de 3,3' diaminobenzidina (1:1) (DAB - Sigma Chemical, St. Louis, EUA, código D7679) por 5 minutos. Seguiu-se a lavagem em banhos de água destilada. A contra-coloração foi feita com solução de hematoxilina de Harris por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente, sendo mantidas em água por 5 minutos. Seguiu-se a desidratação em três banhos de etanol absoluto por um minuto e a diafanização com três banhos de

xilol por 5 minutos. As lâminas foram montadas com lamínulas de vidro e Permount (Fisher Scientific®, Fair Lawn, EUA, código SP15-500).

Foram consideradas imunopositivas as estruturas ou células coradas de marrom. Foram capturadas em média 5 imagens de cada lâmina através de uma microcâmara Dinolite® AM 423X (AmMo Eletronics Corporation, New Taipei city, Taiwan) acoplada ao microscópio Olympus BX-50 (Olympus, Tóquio, Japão) em magnificação de 400X. As imagens foram analisadas no programa de morfometria Image Pro-Plus 4.5, sendo obtida a área de IL-6 em  $\mu\text{m}^2$ .

## 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 A – COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA – CEUA PUCPR



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

NÚCLEO DE BIOÉTICA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer nº: 221/07 CEUA PUCPR  
Registro do projeto no CEUA: 297

Data do parecer: 04/12/2007

**Título do Projeto:**

Análise do processo de reparo em lesão bucal e muscular de ratos submetidos a exercícios físicos.

**Pesquisador responsável:**

Ana Maria Trindade Grégio

**Equipe da pesquisa:**

Eli Luis Namba; Mariele Thomé Jung; Rodrigo Bertier Valentim

**Instituição:**

PUCPR

**Categoria do Experimento - Categoria B**

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Rattus norvegicus albinus, rodentia, mammalia da linhagem wistar	Macho	de 45 a 50 dias, peso de 150g.	166

O colegiado do CEUA em reunião no dia 29/11/2007, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do


pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao senhor pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Curitiba, 4 de dezembro de 2007.

Atenciosamente



  
Profa. Graçinda Maria D. Almeida e Oliveira  
Coordenadora do CEUA  
PUC PR

## ANEXO B – ORIENTAÇÕES PARA AUTOR AMERICAN JOURNAL OF SPORTS MEDICINE

### 1

#### AJSM Manuscript Submission Guidelines

The *American Journal of Sports Medicine* (AJSM) is the official publication of the American Orthopaedic Society for Sports Medicine.

The editor of AJSM, Bruce Reider, can be contacted via e-mail at breider@ajsm.org.

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. Articles published in AJSM may not be published elsewhere without written permission from the publisher.

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 AJSM are solicited by the Associate/Current Concepts Editor, Timothy E. Foster, MD (currentconceptsajsm@msn.com).

Please do NOT submit articles for this section without prior approval of the topic by Dr. Foster; a query letter should be sent to Dr. Foster regarding proposed 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. Journal Contributor Publishing Agreement and AJSM

Author Disclosure Statement. These forms are available for download from the author area of the submission site. The corresponding author must complete the forms and return them to AJSM by e-mail or upload them online as a PDF or Word file using the “upload legal documents” option. As an alternative to the AJSM disclosure form, authors may submit the ICMJE disclosure form along with the AJSM supplemental form available on our website.

A copy of the IRB or other agency approval (or waiver) if animal subjects or human subjects or tissues or health information were used.

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. Only those involved in writing the paper should be included in the author line. Others should be listed as a footnote or acknowledgment. While there is no limit on the number of authors, no more than 12 will be listed on the masthead of the published article; additional authors will be listed at the end of the article.

#### MANUSCRIPT FORMATS

Manuscript pages should be double-spaced with consecutive page numbers and continuous line numbers. The abstract should be included with the manuscript as well as being entered in the Metadata section (except for case reports, which do not require abstracts). 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.

#### MANUSCRIPT PREPARATION

##### Abstract

Abstracts should summarize the contents of the article in 350 words or less. 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 exists.

**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.

**Conclusion:** 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.

**What is known about the subject:** Please state what is currently known about this subject to place your study in perspective for the reviewers.

**What this study adds to existing knowledge:** Please state what this study adds to the existing knowledge. The last two items are for reviewers only and are not included in the word count, but should appear at the end of the abstract in the uploaded text.

**2 Manuscript Submission Guidelines** *The American Journal of Sports Medicine*

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 other published outcomes.

**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 1 group receiving an experimental treatment is compared to 1 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 copyeditor changes, which the author will have an opportunity to verify. Authors with limited fluency in English should have the paper reviewed or edited by a native English speaker to ensure clear presentation of the work. **Papers including human or animal subjects must include a statement of approval by appropriate agencies in the text, and a copy of the approval letter must be uploaded with the submission. If approval was not required, authors must upload a waiver statement from the appropriate agency.** 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 2 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 (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 the acknowledgments in the box provided on the submission page. Give credit to 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 double-spaced in alphabetical order and numbered according to 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* (10th ed) for format. *Note:* References must be retrievable.

Do not include in the reference list meeting presentations 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. For review purposes, unpublished references that are closely related to the submitted paper or are important for understanding it should be uploaded as supplemental files.

References will be linked to Medline citations for the reviewers. Authors can include articles that are in Epubish 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 and Tables

Figures and tables should not exceed 3 journal pages. One journal page equals 1 large table or figure, 2 medium-sized tables or figures, or 4 small tables or figures. Medium-sized *The American Journal of Sports Medicine Manuscript Submission Guidelines*  
**3**

tables and figures will be a page width and half the length of the page; small tables and figures are 1-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 from another source (that is, 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. 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 (eg, 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 image resolution requirements of the publisher, Sage

Publications. Files for line-based drawings (no grayscale) should ideally be submitted in the format they were originally created; if submitting scanned versions, files should be 1200 dots per inch (dpi). Color photos should be submitted at 600 dpi and black-and-white photos at 300 dpi.

Charts and graphs can be submitted in the original form created (eg, Word, Excel, or PowerPoint). Photographs or scanned drawings embedded in Word or PowerPoint are not acceptable for publication. If figures are embedded in the submitted manuscript for ease of reading they should also be submitted as separate files for use in the publication process.

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.

#### Videos

Use of supplementary video is encouraged. Videos may be submitted with a manuscript and, if approved by the editor, will be posted online with the article when published. Video submission 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 copyedited by the publisher. Any extensive changes made by authors on the proofs 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.

#### NIH-Supported Studies

Authors of studies funded by grants from the National Institutes of Health can deposit a copy of their accepted final peerreviewed manuscript and associated figure/table files (pretypeset versions) to the NIH database after a 12-month embargo period from the time their article is published in AJSM.