

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

CURSO DE FISIOTERAPIA

FERNANDO MILANEZ DIAS

**EFEITOS DA FONOFORESE COM NANO PARTICULAS DE
OURO E DMSO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO
ANIMAL DE LESAO TRAUMÁTICA DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO**

CRICIÚMA, NOVEMBRO 2011

FERNANDO MILANEZ DIAS

**EFEITOS DA FONOFRESE COM NANO PARTICULAS DE OURO E
DMSO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO ANIMAL DE
LESAO TRAUMÁTICA DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO**

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

Orientador(a) Técnico: Prof. MSc. Eduardo Ghisi
Victor

Orientador(a) Metodológico: MSc. Lisiane Fabris
Chimento; Prof. Ms. Bárbara Lucia Pinto
Coelho; Prof. Kristian Madeira.

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2011

FERNANDO MILANEZ DIAS

**EFEITOS DA FONOFORSE COM NANO PARTICULAS DE OURO E
DMSO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO ANIMAL DE
LESAO TRAUMÁTICA DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO**

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

Orientador(a) Técnico: Prof. MSc.Eduardo Ghisi Victor.

Orientador(a) Metodológico: MSc.Lisiane Fabris Chiumento; Prof. Ms. Bárbara Lucia Pinto Coelho; Prof; Kristian Madeira.

Criciúma, 7 de novembro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Msc. Eduardo Ghisi Victor - UNESC

Prof. Willians Cassiano Longem

Prof. Tiago Freitas

SUMÁRIO

Capítulo I: Projeto de Pesquisa.....	4
Capítulo II: Artigo Científico.....	24
Capítulo III: Normas da Revista.....	36

CAPÍTULO I – PROJETO DE PESQUISA

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

CURSO DE FISIOTERAPIA

FERNANDO MILANEZ DIAS

**EFEITOS DA FONOFORESE COM NANO PARTICULAS DE
OURO E DMSO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO
ANIMAL DE LESAO TRAUMÁTICA DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO**

CRICIÚMA, SETEMBRO 2010

FERNANDO MILANEZ DIAS

**EFEITOS DA FONOFORESE COM NANO PARTICULAS DE
OURO E DMSO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO
ANIMAL DE LESAO TRAUMÁTICA DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO**

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

Orientador(a) Técnico: Prof. MSc.Eduardo Ghisi
Victor

Orientador(a) Metodológico: MSc.Lisiane Fabris
Chiumento

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2010

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
2 FUNDAMENTAÇÃO METODOLÓGICA	
2.1 Características da Pesquisa.....	8
2.2 Amostra.....	8
2.3 PROCEDIMENTOS DA PESQUISA.....	9
3 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DA PESQUISA.....	11
4 ORÇAMENTO.....	11
REFERENCIAS.....	12

1 INTRODUÇÃO

A lesão muscular ocorre por uma variedade de mecanismos, como forças diretas, incluindo lacerações e contusões no músculo, e forças indiretas relacionadas à tensão exercida sobre o músculo (FUKUSHIMA, 2001). Frequentemente ocorrem em práticas esportivas e atividades diárias. Porém, o processo de reparo é geralmente similar em muitos casos (LI et al., 2005).

As lesões osteomusculares são as mais frequentes na prática esportiva (LASMAR, CAMACHO, 2001). O local de lesão varia com o tipo de esporte praticado, o membro inferior sem dúvida é o local mais acometido pelo maior número de lesões por existir uma relação entre os esportes mais praticados pela população em geral (GARRICK, 1988).

Muitos estudos têm demonstrado um aumento nos marcadores de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil em sangue e tecidos, humanos e de animais, durante e após a lesão muscular (PATTWELL, 2004; NIELS, 2005; ZHAO, 2004). Embora necessário para a defesa celular e demais funções, as ERO, quando produzidas em excesso, podem provocar um desequilíbrio entre a produção e a capacidade de defesa antioxidante, levando a uma condição denominada estresse oxidativo, e agredir os constituintes celulares como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Após a lesão muscular inicial, o estresse oxidativo pode estar aumentado devido a inúmeros locais de geração de ERO dentro do músculo traumatizado. Podemos incluir como fontes primárias de radicais livres durante e após o trauma a mitocôndria, xantina oxidase (XO), metabolismo de prostanóides e o sistema NADPH oxidase (REID, 1994).

Em geral, a lesão muscular esquelética tem uma regeneração rápida formando miotubos em três dias. Funcionalmente, as fibras musculares são reinervadas em 4 a 5 dias, e um reparo total após 21 a 28 dias (AMARAL, 2001). Sabe-se que o processo de regeneração músculo esquelético vem sendo muito estudado, no entanto, questões permanecem obscuras, especialmente os efeitos de vários tratamentos comumente usados para acelerar o processo de regeneração muscular, como também o envolvimento das ERO durante esse processo.

Atualmente, diferentes alternativas terapêuticas vêm sendo propostas visando a recuperação total do paciente portador de lesões musculares no menor tempo possível, devolvendo-lhe assim a condição física funcional normal e possibilitando um melhor rendimento físico (LOPES, COSTA e MOURA, 1995).

O UST é utilizado no tratamento de tecidos moles há mais de seis décadas, sendo atualmente um recurso muito utilizado na prática fisioterápica (WARDEN, 2002). Sendo assim, também o mais utilizado para o tratamento das lesões dos tecidos moles (YOUNG e DYSON, 1990).

Os efeitos do UST sobre o processo de reparação muscular em lesões experimentais vem sendo estudado em diferentes aspectos. (STRATOON, HECKMANN e FRACIS, 1984) utilizaram diferentes intensidades do ultra-som terapêutico para a avaliação histoquímica dos seus efeitos frente o processo de reparação de lesões musculares por contusão e consideraram ser benéfico a aplicação do ultra-som. (RANTANEN ET, AL) Concluíram que o ultra-som terapêutico acelera a reparação muscular após a contusão promovendo a proliferação significativa de células satélites para o sítio da lesão.

Dentro deste contexto, a terapia com ultra-som pulsado (TPU) é comumente usada na reabilitação fisioterapêutica devido a seus efeitos fisiológicos térmicos e não térmicos. Segundo Markert (2005) os estímulos não térmicos de ultra-sonicação são a principal via de ação da TPU, ao contrário dos efeitos térmicos da terapia com ultra-som contínuo. A ação terapêutica da ultra-sonicação pode produzir efeitos de cicatrização em biomarcadores de regeneração muscular, principalmente lesões por contusões e produzir mudanças na permeabilidade de membrana e estimular o transporte de substâncias de mensageiros secundários, como cálcio através da membrana celular (WILKIN, 2004).

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

Sistemas nanométricos são compostos de nanopartículas com dimensões na faixa dos nanômetros – 1 nanometro é igual a 1 bilionésimo de metro, este é um dos campos da nanotecnologia.

Essa revolução vem acontecendo na ciência e tecnologia desde o entendimento que os materiais em escala nanométrica podem apresentar novos

comportamentos e/ou propriedades diferentes daquelas que geralmente apresentam em escala macroscópica. (DURAN, 2006).

O uso terapêutico do ouro pode ser atribuído aos chineses e remonta a 2500 AC. O ouro coloidal vermelho ainda é usado hoje na Índia na forma de medicamento para rejuvenescimento e revitalização (MAHDIHASSAN, 1981). O ouro também tem uma longa história de uso no mundo ocidental como *nervine*, uma substância usada para revitalizar pessoas que sofrem de doenças nervosas (FRICKER e BUCKLEY, 1996). No século XVI o ouro foi recomendado para o tratamento da epilepsia e no princípio do século XIX era utilizado para o tratamento da sífilis. Na segunda década do século XX foi introduzido na terapia da tuberculose (DANIEL e ASTRUC, 2004).

Uma das principais indicações clínicas dos compostos de ouro é para tratamento de doenças reumáticas (SHAW, 1999; FELSON, ANDERSON e MEENAN, 1990). A atividade antitumoral da cisplatina, descoberta em 1969 incitou a investigação desta atividade em outros metais, inclusive o ouro. Estimulando à blindagem de muitas fosfinas que contêm drogas a base de ouro, particularmente o complexo bis(diphos)Au(I). Este complexo mostrou propriedades antitumorais promissoras, porém exibiu toxicidade cardiovascular, o que impediu seu uso clínico (BERNERS-PRICE et al, 1987).

Recentes estudos também sugerem que elas tenham toxicidade comparável com perfurações gastro-intestinais (WOUDE et al, 2004; KERBEL e KAMEN, 2004). Existem inúmeras possibilidades para explorar combinações antiinflamatórias que podem ser de origem inorgânica e com pouco ou nenhum efeito colateral.

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

Dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente dipolar amplamente usado para solubilizar pequenas moléculas orgânicas (CAMICI, 2006). Atualmente, DMSO é comumente usado em estudos no músculo esquelético como um seletivo antioxidante ou como solvente para numerosas drogas (VELASCO, 2003). Sendo altamente permeável, o DMSO tem ação não enzimática e seu poder antioxidante se

dá primariamente como scavenger de radical hidroxil e de outras ERO (MOHANRAJ, 1998).

Méis (1998) e Velasco (2003) postulam que a lesão muscular isquêmica induz o paradoxo do cálcio e do oxigênio que ocorrem por altas concentrações de cálcio intracelular, e o DMSO por possuir efeito direto nesse íon pode proteger a célula de danos estruturais.

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

De acordo com o exposto, a pesquisa tem como **questão problema:** Dentre o Gel comum, e o gel acrescido com DMSO e Nanopartículas de ouro qual apresentará melhores resultados.

E, as seguintes **questões norteadoras:**

1. Quais os efeitos do gel comum , aplicado por meio do ultra-som sobre o estresse oxidativo em ratos wistar submetidos a lesão traumática do músculo gastrocnêmio?
2. Quais os efeitos do gel comum acrescido com nanopartículas de ouro e DMSO, aplicado por meio de ultra-som pulsado sobre o estresse oxidativo em ratos Wistar submetido a lesão traumática do músculo gastrocnêmio?

Para responder, temporariamente, aos questionamentos, formularam-se as seguintes **hipóteses**:

1. TPU é comumente utilizado na reabilitação devido aos seus efeitos fisiológicos térmicos e não térmicos (Johns ET AL.2002; Market, 2005). TPU é uma forma não invasiva de energia mecânica transmitida via transcutanea em ondas de pressão acústica de altas frequências nos tecidos biológicos (Lu, 2009). Os efeitos positivos do TPU numa grande variedade de tecidos conectivos e aos mecanismos moleculares relacionados tem sido avaliados biomecanicamente (Alfredo et al .2009; Piedade, 2008; Freitas et AL.2010).

2. Nanopartículas de ouro também chamadas de nanouro, têm sido ativamente investigadas em uma variada gama de aplicações biomédicas devido a sua biocompatibilidade e facilidade de conjugação a biomoléculas (Sokolov et al. 2004; Levy et al. 2004). De acordo com Tsai (2007) nanouro exerce efeito antiinflamatório diminuindo a infiltração de citocinas proinflamatórias e macrófagos em modelo de artrite.

Portanto, o estudo apresenta como **objetivo geral**: Analisar, dentre o gel comum e o gel acrescido de nanopartículas de ouro e DMSO, qual o de melhor resultado, quando aplicado o ultra-som pulsado sobre o estresse oxidativo em lesão traumática do músculo gastrocnêmio em modelo animal.

E, como **objetivos específicos**:

1. Verificar os efeitos do gel comum aplicado por meio de ultra-som pulsado, sobre o estresse oxidativo em ratos Wistar submetidos a lesões traumáticas do músculo gastrocnêmio.

2. Analisar os efeitos do gel comum associado com nanopartícula de ouro e DMSO, aplicado por meio de ultra-som pulsado, sobre o estresse oxidativo em ratos Wistar submetidos a lesões traumáticas do músculo gastrocnêmio.

A nanopartícula de ouro é um modelo ideal para explorar tais possibilidades por que: é biocompatível (HAINFELD et al, 2006; MUKHERJEE et al, 2005); é de preparação relativamente simples; e porque o ouro é um ácido mole, podendo se ligar fortemente com bases moles como os tiois, por exemplo (BHATTACHARYA e MUKHERJEE, 2008).

2. FUNDAMENTAÇÃO METODOLÓGICA

2.1 Características da Pesquisa

A pesquisa é do tipo experimental, na área da saúde, sub-área Fisioterapia, de natureza aplicada, quantitativa, explicativa, prospectiva, descritiva e bibliográfica. É um estudo randomizado, a realizar-se no Laboratório de Síntese de Compostos com Atividade Biológica – LASICOM, em conjunto com o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício – LAFIBE, localizados na UNESC e vinculados ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde desta instituição. Será realizado de junho de 2010 a setembro de 2011.

2.2 Amostra

Serão utilizados 36 ratos Wistar (200-250g). Os animais serão agrupados em gaiolas específicas, temperatura ambiente controlada em 22°C, ciclo claro-escuro 12:12h e com livre acesso a água e a alimentação.

Os animais serão divididos aleatoriamente em 6 grupos:

- Grupo 1: Sham (Músculo sem lesão)
- Grupo 2: Lesão muscular sem tratamento;
- Grupo 3: Lesão muscular e tratamento com gel salina (0.9%)
- Grupo 4: Lesão muscular e tratamento com gel DMSO (15 mg/kg)
- Grupo 5: Lesão muscular e tratamento com gel nano-ouro (27 µg/kg)
- Grupo 6: Lesão muscular e tratamento com USP (0.8 W/cm²) e gel saline (0.9%)
- Grupo 7: Lesão muscular e tratamento com USP (0.8 W/cm²) e gel DMSO (15 mg/kg).
- Grupo 8: Lesão muscular e tratamento com USP (0.8 W/cm²) e gel nano-ouro (27 µg/kg).
- Grupo 9: Lesão muscular e tratamento com USP (0.8 W/cm²) em conjunto com gel salina + DMSO + nano-ouro

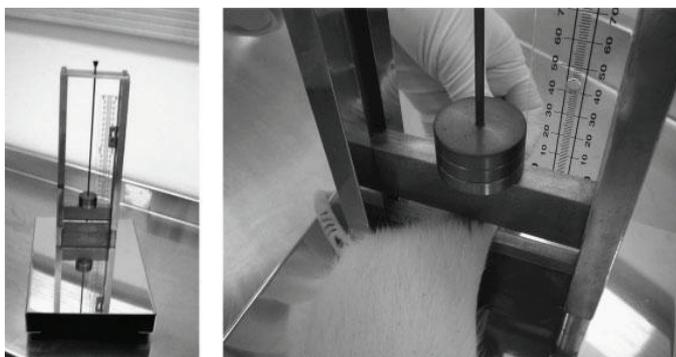
Cálculo do Tamanho da Amostra: Estimou-se uma relação média (\pm DP) da SOD de $4,6 \pm 2,5\%$ no dia "0" após a lesão muscular e de $9,3 \pm 4,8\%$ após o quinto dia o tamanho amostral necessário para detectar uma diferença significativa, considerando um nível de significância de 5% e poder de 80%, é de 28 animais divididos em quatro grupos.

2.3 Procedimentos

Preparação de nanopartículas de ouro: As nanopartículas de ouro serão obtidas por meio de redução química, segundo apresentado por Storhoff (1998). As vidrarias serão lavadas com água régia (3/1 HCl/ HNO₃) e água ultra pura para remoção de água régia residual. As nanopartículas de ouro serão preparadas pela redução do ácido auroclorídrico (HAuCl₄) por citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇). Uma solução aquosa de HAuCl₄ (1mM) foi colocada em refluxo e adicionado 5 ml da solução de citrato de sódio a 38.8mM, o somado resultou em uma mudança em cor de amarelo claro para vermelho. Após a mudança de cor manteve-se o refluxo por mais 15 minutos, permitindo o resfriamento da temperatura.

Protocolo de lesão muscular: O modelo de trauma muscular será desenvolvido de acordo com Rizzi e colaboradores (2006). Os animais serão anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (20mg/kg). Posteriormente, a lesão no gastrocnêmio será realizada por um único impacto por trauma direto de uma prensa desenvolvida pelo Centro Industrial de Equipamentos de Ensino e Pesquisa (CIDEP/RS, Brasil). A lesão será produzida por deslocamento de uma massa metálica (0.459 Kg) que através de uma guia com 18 cm de altura. O impacto produz uma energia cinética de 0.811 J, conforme especificações do equipamento (Figura 1). Os animais controles serão anestesiados para assegurar a padronização, porém expostos ao equipamento sem o trauma muscular.

Figura 1- Equipamento para trauma muscular



Fonte: do pesquisador

Tratamento: O tratamento com ultra-som pulsado (Imbramed, Brazil (6 min de duração, frequência de 1.0 MHz, intensidade de 0.8 W/cm², área de radiação efetiva [ERA] 1 cm²) será aplicado em 2, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 hs após o trauma. A área tratada com USP foi de aproximadamente 2 cm de acordo com Rizzi et al. (2006). O movimento do cabeçote foi circular de acordo com Saliba et al. (2007). Após 2 horas da última aplicação os animais serão eutanasiados por decapitação e o tecido muscular ao redor da lesão será removido cirurgicamente (FREITAS, 2007). Uma parte será utilizada para estudo da função mitocondrial e outra será imediatamente congelada a -80° C para posteriores análises bioquímicas.

Produção de Espécies Reativas de Oxigênio:

a) Ânion Superóxido: determinada pela taxa de oxidação da adrenalina lido em espectrofotômetro a 480nm conforme descrito por Mccord (1969).

Modulação das defesas antioxidantes:

a) Catalase (CAT): A atividade da CAT será determinada pela queda na absorvância (240nm) correspondente ao consumo de peróxido de hidrogênio, conforme previamente descrito por Aebi (1984).

Determinação da Proteína: a quantidade de proteína nos ensaios bioquímicos será mensurada usando a técnica de Lowry et al (1951).

Tratamento Estatístico: Os dados serão expressos em media e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de P<0,05. Será utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 12.0 como pacote estatístico.

3 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DA PESQUISA

Atividades	Calendário													
	2010			2011										
	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N
Elaboração e Qualificação do Projeto	X	X	X											
Comitê de Ética					X	X								
Referencial Teórico		X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Preparação do gel salina + Au-NPs										X	X			
Estudos biológicos <i>in vivo</i>								X	X	X	X			
Análise e interpretação final dos resultados										X	X	X		
Elaboração final do artigo Científico.										X	X	X		
Defesa														X

4 PREVISÃO ORÇAMENTÁRIA

Discriminação	Valor (R\$)
72 animais (ratos Wistar)	400,00
Reagentes para dosagens bioquímica	2.000,00
HAuCl ₃	687,00
Análises químicas (AA, FTIR, MEV)	800,00
Material de expediente	500,00
TOTAL	4.387,00

O projeto será financiado com recursos do Laboratório de Fisiopatologia Experimental e Laboratório de Síntese de Complexos Multifuncionais da UNESC e do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology** 105: 121-126. 1984.
- ALFREDO PP, ANARUMA CA, Pião ACS. Effects of phonophoresis with Arnica montana onto acute inflammatory processing rat skeletal muscles: An experimental study. *Ultrasonics* 2009; 49:466–471.
- AMARAL AC, PARIZOTTO NA, SALVINI TF. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration os skeletal muscle in mice. **Lasers in medical science** 16: 44-51. 2001.
- BANNISTER JV, CALABRESE L. Assays for SOD. **Methods of biochemical analysis** 32: 279-312. 1987.
- BERNERS-PRICE SJ; SADLER PJ. Interaction of the antitumor Au(I) complex [Au(Ph₂P (CH₂)₂PPh₂)₂]Cl with human blood plasma, red cells, and lipoproteins: 31P and 1H NMR studies. **Journal of inorganic biochemistry**. 31: 267–281.1987.
- BROWNE, R.W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Methods in molecular biology** 108: 347-352. 1998.
- BHATTACHARYA R; MUKHERJEE P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews** 60: 1289–1306. 2008.
- CAMICI GG; STEFFEL J; AKHMEDOV A. Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation. **Circulation** 114:1512-1521. 2006.
- DANIEL MC; ASTRUC D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical reviews**. 104: 293–346. 2004.
- DRAPER HH, HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in enzymology** 186:421-431.1990.
- DURAN, N. et al. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. 1^a ed. São Paulo. Artliber. 2006.
- FREITAS LS; FREITAS TP; SILVEIRA PC. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. **Cell Biology International** 31: 482 – 488. 2007.
- FRICKER SP; BUCKLEY RG. Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an in vitro screen for antitumour agents. **Anticancer research** 16: 3755–3760. 1996.
- FUKUSHIMA K; BADLANI N; USAS A. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. **American journal of sports medicine** 29: 394-402. 2001.

GARRET WE Jr. Muscle strain injuries: clinical and basic aspects. *Med Sci Sports Exerc* 1990;22:436-443.

GARRICK JG, REQUA RK. The epidemiology of foot and ankle injuries in sports. *Clin Sports Med*. 1988;14:218-24.

HAINFELD JF; SLATKIN DN; FOCELLA TM; SMILOWITZ HM. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. **British journal of radiology** 79: 248–253. 2006.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE JMC. *Free Radical in Biology Medicine* University Press, Oxford, NY. 2007

HANSEN-SCHWARTZ, J.; NORDSTROM, C.H.; EDVINSSON, L. Human endothelin subtype A receptor enhancement during tissue culture via de novo transcription. **Neurosurgery** 50: 127–133. 2002.

HILL GE; FENWICK S; MATTHEWS BJ. **Ultrasound in medicine & biology** 31: 1701–1706. 2005.

JOHNS LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: The frequency resonance hypothesis. *J Athl Train* 2002; 37:293–299.

LASMAR NP, CAMACHO GL, LASMAR RCP. Medicina do esporte. Reabilitação na atividade esportiva. *Revinter*, 2002. p. 22-424.

LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology** 186: 464-478. 1990.

LEVY R, THANH NT, DOTY RC, HUSSAIN I, NICHOLS RJ, SCHIFFRIN DJ. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J Am Chem Soc* 2004; 126:10076–84.

LI G. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. **Physiological research** 54: 193-199. 2005.

LOPES AS, KATTAN R, COSTA S, MOURA CE, LOPES RS. Diagnóstico e tratamento das contusões musculares. *Rev Bras Ortop*. 1995;30:744-52.

LOWRY, O.H.; ROSEBOUGH, N.G.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry** 193: 265-275. 1951.

LU MH, ZHENG YP, HUANG QH, LU HB, QIN L. Low intensity pulsed ultrasound increases the mechanical properties of the healing tissues at bone-tendon junction. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009; 2009:2141-4.

MAHDIHASSAN S. The tradition of alchemy in India. **American journal of Chinese medicine**. 9: 23–33. 1981.

MARKERT CD. Nonthermal Ultrasound and Exercise in Skeletal Muscle Regeneration. **Archives of physical medicine and rehabilitation** 86: 1304-1310. 2005.

MCCORD, JM; FRIDOVICH I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). **Journal of biological chemistry** 244: 6049–6055. 1969.

MEIS L. Control of heat production by the Ca^{+2} - atpase of rabbit and trout sarcoplasmic reticulum. **American journal of physiology. Cell physiology** 274:1738-1744. 1998.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J.C. Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB J.*, v.19, p.311-330, 2005.

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

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

NIELS BJ; VOLLAARD J; SHEARMAN P. Exercise-Induced Oxidative Stress. **Sports medicine** 35: 1045-1062. 2005.

PATTWELL DM; JACKSON MJ. Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. **Exercise and sport sciences reviews** 32: 14–18. 2004.

PIEPADE MCB, GALHARDO MS, BATTLEHNER CN. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics*. 2008; 48:403–411.

RANTANEN J, THORSSONT O, WOLMER P, HURME T, KALIMO H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med*. 1999; 27:54-9.

REID MB, MOODY MR. Dimethyl sulfoxide depresses skeletal muscle contractility. **Journal of applied physiology** 76: 2186–2190. 1994.

RIZZI CF; MAURIZ JL; CORRÊA DSF. Effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the Nuclear Factor (NF)- κ B Signaling Pathway in Traumatized Muscle. **Lasers in surgery and medicine** 38:704–713. 2006.

SALIBA S; MISTRY DJ; PERRIN DH; GIECK J; WELTMAN A. Phonophoresis and the absorption of dexamethasone in the presence of an occlusive dressing. **Journal of athletic training** 42(3): 349-54. 2007.

SERRANO-MOLLAR A; CLOSA D; CORTIJO J; MORCILLO EJ; PRATS N; GIRONELLA M; PANÉS J; ROSELLÓ-CATAFAU J; BULBENA O. P-selectin

upregulation in bleomycin induced lung injury in rats: effect of N-acetyl-L-cysteine. **Thorax** 57(7): 629-34. 2002.

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

SOKOLOV K, FOLLEN M, AARON J, PAVLOVA I, MALPICA A, LOTAN R. Real-time vital optical imaging of pre-cancer using antiepidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Res* 2003; 63:1999–2004.

STRATTON SA, HECKMANN R, FRANCIS RS. Therapeutic ultrasound, its effects on the integrity of a nonpenetrating wound. *J Orthop Sports Phys Ther*. 1984;5:278-81.

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

TSAI CH, SHIAU A, CHEN S. Amelioration of collagen-Induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis Rheum* 2007; 56:544-54.

VELASCO R; TRUJILLO X; VASQUEZ C. Effect of Dimethyl Sulfoxide on Excitation-Contraction Coupling in Chicken Slow Skeletal Muscle. **Journal of pharmacological sciences** 93: 149 – 154. 2003.

WARDEN SJ, MCMEEKE JM. Ultrasound usage and dosage in sports physiotherapy. *Ultrasound Med Biol*. 2002;28:1075-80

WOESSNER JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. **Archives of biochemistry and biophysics** 93: 440–447. 1961.

WILKIN LD, MERRICK MA; KIRBY TE. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. **International journal of sports medicine** 25: 73-77. 2004.

WOUDE GF; KELLOFF GJ; RUDDON RW; KOO HM; SIGMAN CC; BARRETT JC; DAY RW; DICKER AP; KERBEL RS; PARKINSON DR; SLICHENMYER WJ. Reanalysis of cancer drugs: old drugs, new tricks. **Clinical cancer research** 10: 3897–3907. 2004.

XU Q. Hypoxia-induced astrocytes promote the migration of neural progenitor cells via vascular endothelial factor, stem cell factor, stromal-derived factor-1 α and monocyte chemoattractant protein-1 upregulation *in vitro*. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 34: 624–631. 2007.

YOUNG SR, DYSON M. The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. *Ultrasound Med Biol*. 1990;16:261-9.

ZHAO K; ZHAO G; WU Z. Cell-permeable Peptide Antioxidants Targeted to Inner Mitochondrial Membrane inhibit Mitochondrial Swelling, Oxidative Cell Death, and Reperfusion Injury. **Journal of biological chemistry** 279: 34682–34690. 2004.

ANEXO

TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

EFEITOS DA FONOPORESE COM NANO PARTICULAS DE OURO E DMSO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO ANIMAL DE LESAO TRAUMÁTICA DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO

Effects of phonophoresis with nanoparticles GOLD AND DMSO on oxidative stress in animal models of traumatic injury of the gastrocnemius muscle

Fernando Milanez Dias, **Jonathann Possato, ***Paulo Cesar Lock Silveira, *Marcos Marques da Silva Paula, *****Eduardo Ghisi Victor**

Acadêmico do Curso de Graduação em Fisioterapia da Universidade do Extremo Sul Catarinense e aluno de Iniciação Científica. **Acadêmico do Curso de Graduação em Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense e aluno de Iniciação Científica. *Fisioterapeuta e doutorando pela Universidade Federal de Santa Catarina. ****Coordenador do Laboratório de Síntese de Complexos Multifuncionais da Universidade do Extremo Sul Catarinense. ***** Fisioterapeuta, Professor do Curso de Fisioterapia e doutorando pela Universidade do Extremo Sul Catarinense.*

Endereço para correspondência:

Resumo

Introdução: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da terapia com Ultrassom Pulsado nos parâmetros de estresse oxidativo após uma lesão traumática do músculo. Ratos machos wistar foram divididos e randomizados em nove grupos (n=6). Grupo Controle (músculo não lesionado); lesão muscular sem tratamento; lesão muscular com tratamento com GNP gel; lesão muscular com tratamento com DMSO gel; lesão muscular com tratamento com gel Plus (DMSO + GNP); Lesão muscular e TPU + gel Salina; lesão muscular e TPU + gel GNP; lesão muscular e TPU + gel DMSO; lesão muscular e TPU + gel Plus. A lesão do gastrocnêmio foi induzida por um único impacto traumático brusco. Foi utilizado TPU (6 min de duração, frequência de 1.0 Mhz, intensidade de 0,8 W/cm²) foram utilizados 2, 12, 24 e 48 horas após o trauma.

Resultados: Nossos resultados sugerem que TPU + gel Plus apresentam efeitos benéficos no processo de cura, induzindo a redução na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).

Palavras Chaves: Lesão Muscular, Stress Oxidativo, Ultrassom Terapêutico Pulsado, Fonoforese, nanopartículas de Ouro.

Abstract

Introduction: The aim of this study was to evaluate the effects on TPU with gold nanoparticles on oxidative stress parameters after traumatic muscle injury. Male Wistar rats were divided randomly into nine groups (n=6): sham (uninjured muscle); muscle injury without treatment; muscle injury and treatment with DMSO gel (15 mg/kg); muscle injury and treatment with AuN gel (27 µg); muscle injury and treatment with Plus gel (DMSO + AuN); muscle injury and TPU; muscle injury and TPU + DMSO gel; muscle injury and TPU + AuN gel, muscle injury and TPU + Plus gel. Gastrocnemius injury was induced by a single impact blunt trauma. TPU (6-min duration, frequency of 1.0 MHz, intensity of 0.8 W/cm²) was used 2, 12, 24 and 48 h after trauma. *Results:* Suggest that TPU + Plus gel presents beneficial effects on the muscular healing process, inducing a reduction in the production of ROS.

Key words: muscle injury; oxidative damage; therapeutic pulsed ultrasound; phonophoresis; gold nanoparticles.

INTRODUÇÃO

A recuperação da musculatura esquelética em resposta ao trauma depende do tipo de lesão como, contusão, estiramento e laceração e na sua severidade. No entanto geralmente o processo de recuperação consiste em três fases: fase de destruição, fase de reparo e fase de remodelamento. A fase de destruição é caracterizada por necrose, hematoma e formação das células de influxo inflamatório [1].

A lesão induz um aumento da geração de ROS no músculo esquelético, que altera o balanço intracelular oxidante-antioxidante em favor da lesão e pode resultar em dano oxidativo do músculo traumatizado, quando a produção de ROS subjugar o sistema de defesa antioxidante [2]. Múltiplos sítios potenciais de geração de ROS no músculo esquelético têm sido identificados, incluindo a mitocôndria, enzima oxidase NADPH, processo A2-dependente fosfolipase e Xantina Oxidase [3].

Neste contexto TPU é comumente utilizado na reabilitação devido aos seus efeitos fisiológicos térmicos e não térmicos [4,5]. TPU é uma forma não invasiva de energia mecânica transmitida via transcutânea em ondas de pressão acústica de altas frequências nos tecidos biológicos [6]. Os efeitos positivos do TPU numa grande variedade de tecidos conectivos e os mecanismos moleculares relacionados têm sido avaliados biomecanicamente [7,8,9].

A nível celular tem se colocado hipóteses de que mudanças nas taxas difusão e na permeabilidade da membrana aos íons podem estimular a regeneração das células por aumento da sinalização molecular [10,11].

Por causa disto, TPU pode seu utilizado junto a drogas antiinflamatórias e antioxidantes, promovendo uma absorção ampliando os efeitos dessas drogas. Utilizando as ondas de ultrassom, a fonoforese objetiva alcançar concentrações terapêuticas relevantes da droga introduzida por via transdêrmica nos tecidos sujeitos ao procedimento [12].

Nanopartículas de ouro também chamadas de nanoouro, têm sido ativamente investigadas em uma variada gama de aplicações biomédicas devido a sua biocompatibilidade e facilidade de conjugação a biomoléculas [13,14]. De acordo com Tsai [15], nanoouro exerce efeito antiinflamatório diminuindo a infiltração de citocinas próinflamatórias e macrófagos em modelo de artrite.

Devido às propriedades antiinflamatórias do TPU e o crescente interesse em pesquisas com nanopartículas de ouro este estudo tem como objetivo na junção destes dois tratamentos (Fonoforese) avaliando seus efeitos nos parâmetros de estresse oxidativo após lesão muscular traumática.

MATERIAIS E MÉTODOS

Síntese de nanopartículas de ouro foram preparadas como descrito anteriormente por Turkevchet [16].

Resumidamente, uma solução aquosa de citrato de sódio foi adicionada a solução de tetra auroclorato de hidrogênio (HAuCl₄) previamente aquecida a 90 ° C. O sistema foi mantido sob refluxo, com agitação magnética por 20 min. Nanopartículas de ouro foram caracterizadas por UV-vis e TEM (microscopia eletrônica de transmissão). O espectro eletrônico mostra um pico de absorção a aproximadamente 520 nm, atribuída à absorção de ressonância de plasmons de superfície. Imagem TEM de nanopartículas revelaram a presença de partículas esféricas com uma média de diâmetro de partículas de 25 nm.

É um estudo randomizado, realizado no Laboratório de Síntese de Compostos com Atividade Biológica – LASICOM, em conjunto com o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício – LAFIBE, localizados na UNESC e vinculados ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde desta instituição. Será realizado de junho de 2010 a setembro de 2011.

Animais

Ratos machos Wistar (250-300g) obtidos a partir do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Brasil, foram enjaulados em grupos de seis e oferecida ração comercial e água *ad libitum* e mantidos em ciclo de 12h claro/escuro. Os animais foram divididos aleatoriamente em nove grupos; Grupo Controle (músculo não lesionado); Lesão muscular sem tratamento; lesão muscular com tratamento com GNP gel; lesão muscular com tratamento com DMSO gel; lesão muscular com tratamento com gel Plus (DMSO + GNP); Lesão muscular e TPU + gel Salina; lesão muscular e TPU + gel GNP; lesão muscular e TPU + gel DMSO; lesão muscular e TPU + gel Plus. Todos os estudos foram realizados em conformidade as diretrizes do National Institutes of Health e com a aprovação do Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, Brasil.

Modelo de lesão muscular

O modelo de trauma muscular utilizado foi descrito por Rizzi et al [17]. O animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (70 mg / kg) e xilazina (15 mg / kg). A lesão do gastrocnêmio foi induzida por um trauma único de impacto direto uma prensa desenvolvida pelo Centro Industrial de Equipamentos de Ensino e Pesquisa (CIDEP / Porto Alegre, RS, Brasil). Resumidamente, a lesão foi produzida por uma massa de metal (0,459 kg) caindo através de um guia de metal de uma altura de 18 cm. A energia de impacto cinético enpregues foi 0,811 Joules. Os Ratos controle também foram anestesiados para garantir a normalização, mas sem trauma muscular.

Tratamento

Tratamento pulsado de ultrassom (Imbramed, Amparo, São Paulo, Brasil (6 min duração, frequência de 1,0 MHz, a intensidade de 0,8 W/cm², área de radiação efetiva [ERA] cm², ciclo de trabalho de 50% de 1:2 [5 ms on, 5 ms off], as aplicações foram realizadas 2, 12, 24, 48 h após o trauma muscular [18]. A área tratada com ultrassom foi de aproximadamente 2 cm, de acordo com Rizzi et al. [17]. O movimento do feixe foi circular, de acordo com Saliba et al [19]. Os grupos com lesão muscular e tratamento com gel GNP e gel Plus também foram expostos ao tratamento por 6 min.

Protocolo de Sacrifício

Duas horas após a última aplicação, os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue foi coletado. A região lesada do músculo gastrocnêmio foi cirurgicamente removido e imediatamente processado, aliquotado e estocado a -70 ° C para posterior análise.

Preparação de amostras

O gastrocnêmio foi homogeneizado no buffer usado para cada técnica. Os homogeneizados foram centrifugados a 1000 g por 10 min a 4 ° C e os sobrenadantes mantidos a -70° C até ser utilizado para os experimentos. O período máximo entre a preparação do homogeneizado e análise bioquímica foi sempre inferior a 5 dias.

Ensaio bioquímico

Ânion superóxido

Ânion superóxido foi determinada no tecido através da taxa de oxidação do adrenalina lida a partir da absorvância a 780 nm, como descrito por McCord [20]. Resultados foram expressos em nmol / min / mg de proteína.

Atividade da catalase (CAT)

Atividade da catalase foi medida pela taxa de diminuição do peróxido de hidrogênio absorvância a 240 nm = λ_{max} [21] e os resultados foram expressos em U CAT / mg proteína.

Determinação de proteínas

A quantidade de proteína nas amostras testadas para TBARS, carbonil proteína e atividades de enzimas foram determinados usando a técnica de Lowry [22].

Análise estatística

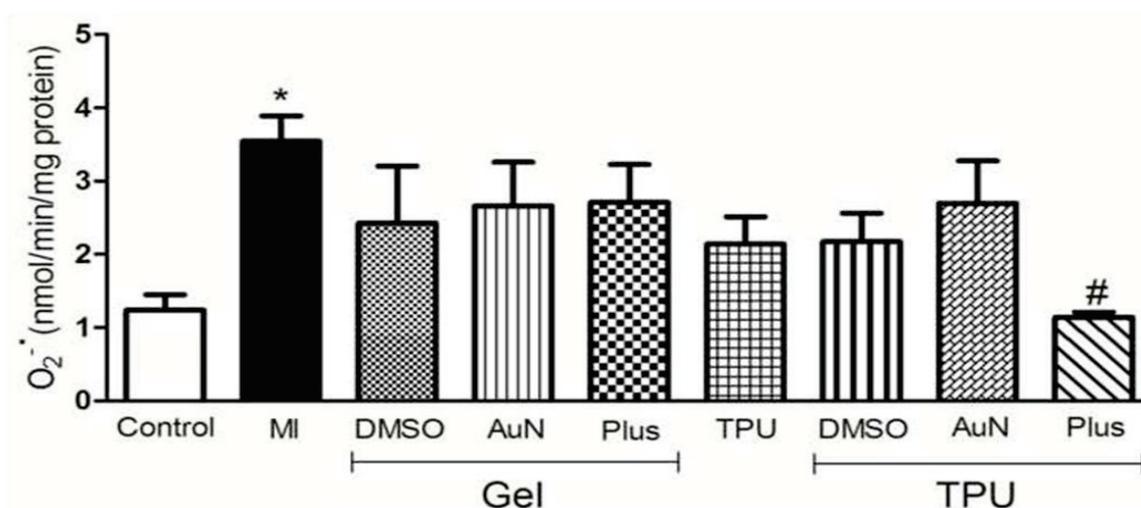
Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido pelo Teste de Tukey quando os valores de p foram significativos ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistical Package for the Social Science (SPSS, Lagoa Santa, São Paulo, Brasil).

RESULTADOS

Produção de ânion superóxido

O grupo de ratos com lesão muscular e nenhum tratamento teve um aumento significativo em relação ao grupo controle, e apenas o grupo TPU + gel Plus exibiu um significativo decréscimo em comparação com o grupo muscular lesionado sem tratamento (Figura 1).

Figura I - Níveis de Ânion Superóxido pós-testes. (N=06)

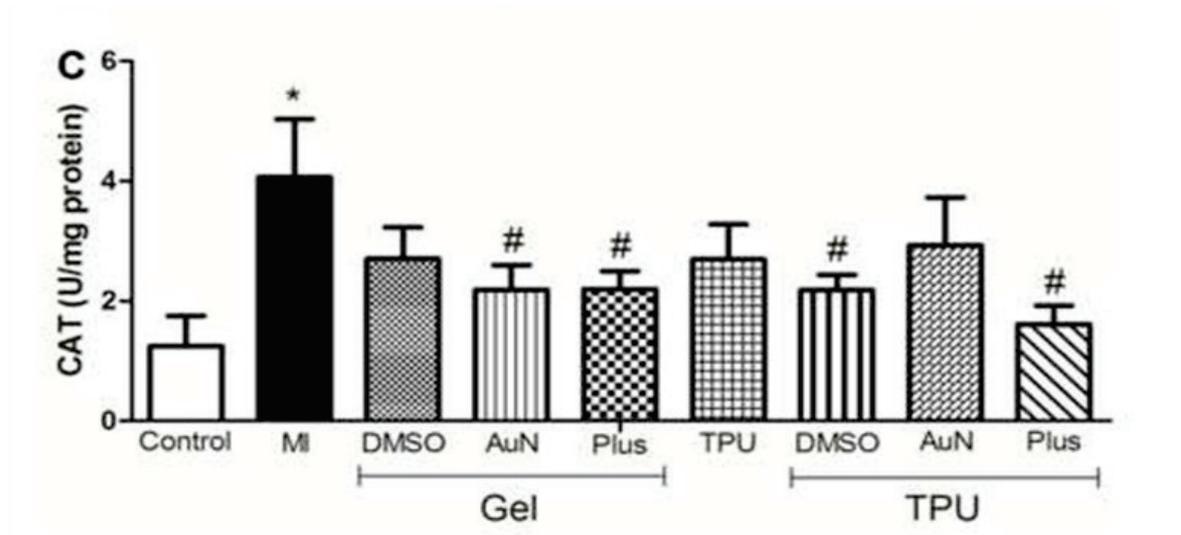


Efeito do ultra-som pulsado terapêutico (TPU) + gel Plus em produção de ânion superóxido no músculo esquelético após a lesão (48 h). Os dados são expressos como média \pm SEM de seis animais. Diferente do sham (* $p < 0,05$) e diferente de lesão muscular sem tratamento (# $p < 0,05$). (Teste de Tukey).

Catalase

Um aumento significativo foi observado na atividade das três enzimas antioxidantes no grupo lesão muscular sem tratamento. Somente o TPU + Plus gel grupo apresentou uma diminuição significativa na atividade das três enzimas antioxidantes (Figura 2).

Figura II - Níveis de Catalase pós-testes.



Efeito do ultra-som pulsado terapêutico (TPU) + Plus gel sobre os níveis de catalase no músculo esquelético após a lesão (48 h). Os dados são expressos como média \pm SEM de seis animais. Diferente do sham (* $p < 0,05$) e diferente de lesão muscular sem tratamento (# $p < 0,05$). (Teste de Tukey).

DISCUSSÃO

Estudo teve como objetivo investigar e comparar os efeitos de nanopartículas de ouro e DMSO em conjunto com TPU na lesão muscular induzida. Para demonstrar este efeito, foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo 48 h após a realização de lesões.

Estudos realizados nos últimos 15 anos indicam que as espécies reativas de oxigênio (Superóxido, radicais hidroxila, óxido nítrico, peroxinitrito e radicais livres derivados peróxido de hidrogênio do produto) desempenham um papel importante na inflamação e ou infecção induzida por alterações na função muscular [23, 24, 25, 26]. ROS são essenciais para proteger a célula contra a invasão de agentes infecciosos. No entanto, quando a produção de ROS é excessiva, biomoléculas podem ser danificados e do processo de recuperação do tecido lesado poderia ser prejudicado [27].

A produção de ânion superóxido foi reduzido apenas no grupo de TPU + Plus gel, quando comparado ao grupo lesão não tratado, mostrando que a fonoforese foi eficaz na melhorara deste parâmetro no grupo DMSO + GNP (gel Plus) (Figura 1). Baixa freqüência do TPU tem se mostrado eficiente no aumento da penetração cutânea dos medicamentos tópicos in vivo sobre a pele humana. A explicação para o aumento da permeabilidade transdérmica devido à baixa freqüência do TPU está ligada em parte aos seus efeitos térmicos, e é atribuído principalmente à cavitação [10, 28, 29].

Devido à variedade de efeitos biológicos do DMSO, este anti-inflamatório tópico tem se tornado objeto de inúmeros estudos farmacológicos. Essas propriedades incluem melhora do fluxo de sangue, a restrição de entrada de Na^+ e Ca_2^+ tóxicos nas células, o bloqueio de trombose causada por fatores teciduais, edema e moléculas inflamatórias [30].

Recentes avanços na tecnologia de ouro permitiram a criação de sondas com propriedades e desempenho melhoradas para os estudos da célula: maior densidade de rotulagem, melhor sensibilidade e maior penetração nos tecidos. De acordo com Tsai [15], nanoouro tem efeito anti-inflamatório agindo positivamente sobre citocinas pró-inflamatórias e infiltração de macrófagos em um modelo de artrite. É provável que essas terapias tenham realmente agindo em conjunto, o que explica a diminuição significativa na produção de ânion superóxido.

Para demonstrar que a fonoforese usada em conjunto com GNP + DMSO foi eficaz na redução do estresse oxidativo após lesão muscular, foram avaliados parâmetros de dano oxidativo e atividade enzimática antioxidante. Quanto a atividade da enzima antioxidante (Figura 2) o grupo de TPU + Plus gel foi o único com uma redução significativa na atividade da catalase. Isto mostra que o grupo de TPU + Plus gel mostrou maior eficiência contra o estresse oxidativo na lesão muscular induzida.

O uso de ultra-som por si só acelera a recuperação de lesões musculares [31], mas estes efeitos podem ser potencialmente melhorados com o uso adjunto de agentes farmacológicos. Assim, o uso combinado de ultra-som e agentes anti-inflamatórios representa uma alternativa importante no tratamento de lesões musculares [18].

DMSO estabiliza as membranas celulares da formação de excesso radicais livres e entrada anormal de Ca^{2+} nas células, melhorando a cicatrização do músculo. A administração DMSO durante reoxigenação resultou em um aumento significativo no ATP associado significativamente a níveis menores de lactato e uma boa recuperação muscular [32]. Assim, um aumento na ATP combinado com reduzido consumo de energia pode refletir mudanças favoráveis na balança da oferta e demanda de energia durante eventos isquêmicos /hipóxia, tais como na lesão traumática [33].

A inflamação aguda do tecido é uma resposta a uma lesão inicial, é caracterizada por um rápido aumento do fluxo sanguíneo local, a permeabilidade vascular e um influxo de neutrófilos [34]. Portanto, a terapia anti-angiogênica poderia ser uma opção de tratamento para a lesão muscular traumática. Em um estudo que utilizou a avaliação radiográfica, Bhattacharya e Mukherjee [35], confirmaram que a administração de nanopartículas de ouro reduziu significativamente a inflamação articular. Da mesma forma, no presente estudo, coloração imuno- histoquímica revelou uma diminuição significativa na infiltração de macrófagos para a sinóvia de ratos com artrite no grupo tratado com nanopartículas de ouro.

Hoje em dia, numerosos estudos têm sido realizados para avaliar o efeito do ultrassom pulsado em combinação com agentes anti-inflamatórios, demonstrando que esta associação melhora a resposta da inflamação muscular. Apesar do caráter preliminar dos resultados do presente estudo, sugerimos que TPU + DMSO + GNP apresenta efeitos benéficos na cicatrização muscular, provavelmente por acelerar a fase inflamatória e induzir uma redução na produção de ROS. Mais estudos estão sendo realizados em nosso laboratório para entender melhor os efeitos biológicos dessa terapia na cicatrização muscular.

REFERENCIAS

- [1] Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J. Cell. Physiol* 2010; 224: 7–16.
- [2] Saborido A, Naudí A, Portero-Otín M. Treatment decreases the mitochondrial ROS generation and oxidative stress induced by acute exercise in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. Epub ahead of print, 2010.
- [3] Jackson MJ. Redox regulation of adaptive responses in skeletal muscle to contractile activity. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 1267-1275.
- [4] Johns LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: The frequency resonance hypothesis. *J Athl Train* 2002; 37:293–299.
- [5] Markert CD. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil* 2005; 86:1304–1310.
- [6] Lu MH, Zheng YP, Huang QH, Lu HB, Qin L. Low intensity pulsed ultrasound increases the mechanical properties of the healing tissues at bone-tendon junction. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009; 2009:2141-4.
- [7] Alfredo PP, Anaruma CA, Pião ACS. Effects of phonophoresis with Arnica montana onto acute inflammatory processing rat skeletal muscles: An experimental study. *Ultrasonics* 2009; 49:466–471.
- [8] Piedade MCB, Galhardo MS, Battlehner CN. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics*. 2008; 48:403–411.
- [9] Freitas TP, Gomes M, Fraga DB, Freitas LS, Rezin GT, Santos PM, Silveira PCL, Paula MM, Pinho RA, Streck EL. Effect of Therapeutic Pulsed Ultrasound on Lipoperoxidation and Fibrogenesis in an Animal Model of Wound Healing. *J Surg Res* 2010; 161, 168–171.
- [10] Maruani A, Boucaud A, Perrodeau E. Low-frequency ultrasound phonophoresis to increase the efficiency of topical steroids: A pilot randomized study of humans. *Int J Pharm*. 2010; 395:84-90.
- [11] Yang JH, Kim TY, Lee JH. Anti-Hyperalgesic and anti-inflammatory effects of ketorolactromethamine gel using pulsed ultrasound in inflamed rats. *Arch Pharm Res* 2008; 31:511-517.
- [12] Goraj-szczypiorowska B. Evaluation of factors influencing the quality and efficacy of ultrasound and phonophoresis treatment. *Medsportpress* 2007; 5:449–458.
- [13] Sokolov K, Follen M, Aaron J, Pavlova I, Malpica A, Lotan R. Real-time vital optical imaging of pre-cancer using antiepidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Res* 2003; 63:1999–2004.

- [14] Levy R, Thanh NT, Doty RC, Hussain I, Nichols RJ, Schiffrin DJ. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J Am Chem Soc* 2004; 126:10076–84.
- [15] Tsai CH, Shiau A, Chen S. Amelioration of collagen-Induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis Rheum* 2007; 56:544-54.
- [16] Turkevich J, Stevenson P, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc* 1951; 11: 55–60.
- [17] Rizzi CF, Mauriz JL, Corrêa DSF, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, Marroni NP, Saliba S, Mistry DJ, Perrin DH. Phonophoresis and the absorption of dexamethasone in the presence of an occlusive dressing. *J Athl Train* 2007; 42:349-54.
- [18] Silveira PCL, Victor EG, Schefer D. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. *Ultrasound in Med. & Biol* 2010;36:44–50.
- [19] SALIBA S; Mistry DJ; PERRIN DH; GIECK J; WELTMAN A. Phonophoresis and the absorption of dexamethasone in the presence of an occlusive dressing. **Journal of athletic training** 42(3): 349-54. 2007.
- [20] Mccord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244:6049–6055.
- [21] Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 1984; 105:121–126.
- [22] Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265–275.
- [23] Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:345–353.
- [24] Supinski GS, Callahan LA. Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *J Appl Physiol* 2007; 102:2056–2063.
- [25] Brunellia S, Rovere-Querinic P. The immune system and the repair of skeletal muscle. *Pharmacol Res* 2008; 58:117-121.
- [26] Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of Mammalian Skeletal Muscle: Basic Mechanisms and Clinical Implications. *Curr Pharm Des* 2010; 16:906-914.
- [27] Kerkweg U, Petrat F, Korth HG, Groot H. Disruption Of skeletal myocytes initiates superoxide release: contribution of NAD(P)H oxidase. *SHOCK* 2007; 27:552–558.
- [28] Tang H, Wang CC, Blankschtein D, Langer R. An investigation of the role of cavitation in low-frequency ultrasound-mediated transdermal drug transport. *Pharm. Res* 2002; 19:1160–1169.
- [29] Tezel A, Sens A, Mitragotri S. Investigations of the role of cavitation in low-frequency

phonophoresis using acoustic spectroscopy. *J Pharm Sci* 2002; 91:444–453.

[30] Ikeda Y, Long DM. Comparative effects of direct and indirect hydroxyl radical scavengers on traumatic brain oedema. *Acta NeurochirSuppl* 1990;51:74–76.

[31] Freitas LS, Freitas TP, Silveira PC, Rocha LG, Pinho RA, Streck EL. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury. *Cell Biol Int* 2007; 31:482–488.

[32] Gilboe DD, Kintner D, Fitzpatrick JH, Emoto SE, Esanu A, Braquet PG, Bazan NG: Recovery of postischemic brain metabolism and function following treatment with a free radical scavenger and platelet-activating factor antagonists. *J Neurochem*, 1991, 56, 311–319.

[33] Jacob SW, de la Torre JC. Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. *Pharmacol Rep* 2009; 61:225-35.

[34] Pansarasa O, Bertorelli L, Vecchiet J, Felzani G, Marzatico F. Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free RadicBiol Med*1999; 27:617–622.

[35] Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60:1289-306.

ANEXO III – NORMAS DA REVISTA

Normas de Publicação - *Fisioterapia Brasil*

Revista Indexada na LILACS - Literatura Latinoamericana e do Caribe em Ciências da Saúde, CINAHL, LATINDEX

Abreviação para citação: Fisioter Bras

A revista *Fisioterapia Brasil* é uma publicação com periodicidade bimestral e está aberta para a publicação e divulgação de artigos científicos das várias áreas relacionadas à Fisioterapia.

Os artigos publicados em *Fisioterapia Brasil* poderão também ser publicados na versão eletrônica da revista (Internet) assim como em outros meios eletrônicos (CD-ROM) ou outros que surjam no futuro. Ao autorizar a publicação de seus artigos na revista, os autores concordam com estas condições.

A revista *Fisioterapia Brasil* assume o “estilo Vancouver” (*Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals*) preconizado pelo Comitê Internacional de Diretores de Revistas Médicas, com as especificações que são detalhadas a seguir. Ver o texto completo em inglês desses Requisitos Uniformes no site do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), www.icmje.org, na versão atualizada de outubro de 2007.

Submissões devem ser enviadas por e-mail para o editor executivo (artigos@atlanticaeditora.com.br). A publicação dos artigos é uma decisão dos editores. Todas as contribuições que suscitarem interesse editorial serão submetidas à revisão por pares anônimos.

Segundo o Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96, para estudos em seres humanos, é obrigatório o envio da carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, independente do desenho de estudo adotado (observacionais, experimentais ou relatos de caso). Deve-se incluir o número do Parecer da aprovação da mesma pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital ou Universidade, a qual seja devidamente registrada no Conselho Nacional de Saúde.

1. Editorial

O Editorial que abre cada número da *Fisioterapia Brasil* comenta acontecimentos recentes, inovações tecnológicas, ou destaca artigos importantes publicados na própria revista. É realizada a pedido dos Editores, que podem publicar uma ou várias Opiniões de especialistas sobre temas de atualidade.

2. Artigos originais

São trabalhos resultantes de pesquisa científica apresentando dados originais com relação a aspectos experimentais ou observacionais, em estudos com animais ou humanos.

Formato: O texto dos Artigos originais é dividido em Resumo (inglês e português), Introdução, Material e métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Agradecimentos (optativo) e Referências.

Texto: A totalidade do texto, incluindo as referências e as legendas das figuras, não deve ultrapassar 30.000 caracteres (espaços incluídos), e não deve ser superior a 12 páginas A4, em espaço simples, fonte Times New Roman tamanho 12, com todas as formatações de texto, tais como negrito, itálico, sobre-escrito, etc.

Tabelas: Recomenda-se usar no máximo seis tabelas, no formato Excel ou Word.

Figuras: Máximo de 8 figuras, em formato .tif ou .gif, com resolução de 300 dpi.

Literatura citada: Máximo de 50 referências.

3. Revisão

São trabalhos que expõem criticamente o estado atual do conhecimento em alguma das áreas relacionadas à Fisioterapia. Revisões consistem necessariamente em análise, síntese, e avaliação de artigos originais já publicados em revistas científicas. Será dada preferência a revisões sistemáticas e, quando não realizadas, deve-se justificar o motivo pela escolha da metodologia empregada.

Formato: Embora tenham cunho histórico, Revisões não expõem necessariamente toda a história do seu tema, exceto quando a própria história da área for o objeto do artigo. O artigo deve conter resumo, introdução, metodologia, resultados (que podem ser subdivididos em tópicos), discussão, conclusão e referências.

Texto: A totalidade do texto, incluindo a literatura citada e as legendas das figuras, não deve ultrapassar 30.000 caracteres, incluindo espaços.

Figuras e Tabelas: mesmas limitações dos Artigos originais.

Literatura citada: Máximo de 50 referências.

4. Relato de caso

São artigos que apresentam dados descritivos de um ou mais casos clínicos ou terapêuticos com características semelhantes. Só serão aceitos relatos de casos não usuais, ou seja, doenças raras ou evoluções não esperadas.

Formato: O texto deve ser subdividido em Introdução, Apresentação do caso, Discussão, Conclusões e Referências.

Texto: A totalidade do texto, incluindo a literatura citada e as legendas das figuras, não deve ultrapassar 10.000 caracteres, incluindo espaços.

Figuras e Tabelas: máximo de duas tabelas e duas figuras.

Literatura citada: Máximo de 20 referências.

5. Opinião

Esta seção publica artigos curtos, que expressam a opinião pessoal dos autores: avanços recentes, política de saúde, novas idéias científicas e hipóteses, críticas à interpretação de estudos originais e propostas de interpretações alternativas, por exemplo. A publicação está condicionada a avaliação dos editores quanto à pertinência do tema abordado.

Formato: O texto de artigos de Opinião tem formato livre, e não traz um resumo destacado.

Texto: Não deve ultrapassar 5.000 caracteres, incluindo espaços.

Figuras e Tabelas: Máximo de uma tabela ou figura.

Literatura citada: Máximo de 20 referências.

6. Cartas

Esta seção publica correspondência recebida, necessariamente relacionada aos artigos publicados na *Fisioterapia Brasil* ou à linha editorial da revista. Demais contribuições devem ser endereçadas à seção Opinião. Os autores de artigos eventualmente citados em Cartas serão informados e terão direito de resposta, que será publicada simultaneamente. Cartas devem ser breves e, se forem publicadas, poderão ser editadas para atender a limites de espaço. A publicação está condicionada a avaliação dos editores quanto à pertinência do tema abordado.

Preparação do original

- Os artigos enviados deverão estar digitados em processador de texto (Word), em página A4, formatados da seguinte maneira: fonte Times New Roman tamanho 12, com todas as formatações de texto, tais como negrito, itálico, sobrescrito, etc.
- Tabelas devem ser numeradas com algarismos romanos, e Figuras com algarismos arábicos.
- Legendas para Tabelas e Figuras devem constar à parte, isoladas das ilustrações e do corpo do texto.
- As imagens devem estar em preto e branco ou tons de cinza, e com resolução de qualidade gráfica (300 dpi). Fotos e desenhos devem estar digitalizados e nos formatos .tif ou .gif.

Imagens coloridas serão aceitas excepcionalmente, quando forem indispensáveis à compreensão dos resultados (histologia, neuroimagem, etc).

Página de apresentação

A primeira página do artigo traz as seguintes informações:

- Título do trabalho em português e inglês;
- Nome completo dos autores e titulação principal;
- Local de trabalho dos autores;
- Autor correspondente, com o respectivo endereço, telefone e E-mail;

Resumo e palavras-chave

A segunda página de todas as contribuições, exceto Opiniões, deverá conter resumos do trabalho em português e em inglês e cada versão não pode ultrapassar 200 palavras. Deve conter introdução, objetivo, metodologia, resultados e conclusão.

Abaixo do resumo, os autores deverão indicar 3 a 5 palavras-chave em português e em inglês para indexação do artigo. Recomenda-se empregar termos utilizados na lista dos DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) da Biblioteca Virtual da Saúde, que se encontra em <http://decs.bvs.br>.

Agradecimentos

Agradecimentos a colaboradores, agências de fomento e técnicos devem ser inseridos no final do artigo, antes das Referências, em uma seção à parte.

Referências

As referências bibliográficas devem seguir o estilo Vancouver. As referências bibliográficas devem ser numeradas com algarismos arábicos, mencionadas no texto pelo número entre colchetes [], e relacionadas nas Referências na ordem em que aparecem no texto, seguindo as normas do ICMJE.

Os títulos das revistas são abreviados de acordo com a *List of Journals Indexed in Index Medicus* ou com a lista das revistas nacionais e latinoamericanas, disponível no site da Biblioteca Virtual de Saúde (www.bireme.br). Devem ser citados todos os autores até 6 autores. Quando mais de 6, colocar a abreviação latina et al.

Exemplos:

1. Phillips SJ, Hypertension and Stroke. In: Laragh JH, editor. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New-York: Raven Press; 1995.p.465-78.

Yamamoto M, Sawaya R, Mohanam S. Expression and localization of urokinase-type plasminogen activator receptor in human gliomas. *Cancer Res* 1994;54:5016-20.

Envio dos trabalhos

A avaliação dos trabalhos, incluindo o envio de cartas de aceite, de listas de correções, de exemplares justificativos aos autores e de uma versão pdf do artigo publicado, exige o pagamento de uma taxa de R\$ 150,00 a ser depositada na conta da editora: Banco do Brasil, agência 3114-3, conta 5783-5, titular: ATMC Ltda. Os assinantes da revista são dispensados do pagamento dessa taxa (Informar por e-mail com o envio do artigo).

Todas as contribuições devem ser enviadas por e-mail para o editor executivo, Jean-Louis Peytavin, através do e-mail artigos@atlanticaeditora.com.br. O corpo do e-mail deve ser uma carta do autor correspondente à Editora, e deve conter:

- Resumo de não mais que duas frases do conteúdo da contribuição;
- Uma frase garantindo que o conteúdo é original e não foi publicado em outros meios além de anais de congresso;
- Uma frase em que o autor correspondente assume a responsabilidade pelo conteúdo do artigo e garante que todos os outros autores estão cientes e de acordo com o envio do trabalho;
- Uma frase garantindo, quando aplicável, que todos os procedimentos e experimentos com humanos ou outros animais estão de acordo com as normas vigentes na Instituição e/ou Comitê de Ética responsável;
- Telefones de contato do autor correspondente.

- A área de conhecimento:

- | | | |
|--|--|--|
| <input type="checkbox"/> Cardiovascular / pulmonar
cinético-funcional | <input type="checkbox"/> Saúde funcional do idoso | <input type="checkbox"/> Diagnóstico |
| <input type="checkbox"/> Terapia manual | <input type="checkbox"/> Eletrotermofototerapia | <input type="checkbox"/> Orteses, próteses e equipamento |
| <input type="checkbox"/> Músculo-esquelético do trabalhador | <input type="checkbox"/> Neuromuscular | <input type="checkbox"/> Saúde funcional |
| <input type="checkbox"/> Controle da dor da criança | <input type="checkbox"/> Pesquisa experimental /básica | <input type="checkbox"/> Saúde funcional |
| <input type="checkbox"/> Metodologia da pesquisa | <input type="checkbox"/> Saúde funcional do homem | <input type="checkbox"/> Prática política, legislativa e educacional |

() Saúde funcional da mulher

() Saúde pública

() Outros

Observação: o artigo que não estiver de acordo com as normas de publicação da Revista *Fisioterapia Brasil* será devolvido ao autor correspondente para sua adequada formatação.

Information for authors – *Physical Therapy Brazil*

Physical Therapy Brazil is indexed in LILACS (*Literatura Latinoamericana e do Caribe em Ciências da Saúde*), CINAHL, LATINDEX

Abreviation for citation: Fisioter Bras

Physical Therapy Brazil (**PTB**) is a bimonthly journal and promotes clinical and basic studies, original researches and literature reviews related to Physical Therapy. Our readership includes physical therapist clinicians, researchers, educators, students and all health care professionals interested in rehabilitation sciences.

PTB endorses the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* put forth by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), with the main specifications below. The complete text in English of these Uniform Requirements is available on the website of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), www.icmje.org, in the current version of October 2007 (the complete text is also available in pdf on the website of Atlântica Editora, www.atlanticaeditora.com.br)

Articles published in PTB may also be published in the electronic version of the Journal (Internet, CD-ROM), as well as other electronic support that arise in the future. By authorizing the publication in the journal, the authors agree with these conditions.

Articles should be sent by e-mail to the executive editor (artigos@atlanticaeditora.com.br). The publication is an editor decision. All the manuscripts received that raise interest editorial will be submitted to anonymous peer-review.

According to the Health National Council of Brazil, resolution 196/96, for all the studies involving human beings, the author should attach to the article the Ethics and Research Committee agreement, independently of the study design (observational, experimental or case study). The author should

include the agreement register from the Ethics and Research Committee of the Hospital or University. This Committee must be registered by the Health National Council of Brazil.

All submissions accepted for peer review are privileged communications. Author identity is kept confidential from reviewers, unless otherwise indicated.

PTB reviews and considers a manuscript for exclusive publication with the understanding that the manuscript - including any original research findings or data reported in it - has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere, whether in print or electronic form.

Authors agree to execute copyright transfer as requested during the submission process. Manuscripts published in **PTB** become the property of Atlantica Editora and may not be published elsewhere, in whole or in part, in print or electronic form, without the written permission of Atlantica Editora, which has the right to use, reproduce, transmit, derivate, publish, and distribute the contribution, in **PTB** or otherwise, in any form or medium.

1. Editorial

The editorial comments recent events, technological innovations, or highlight important works published in the journal. It is written by editors, or invited experts. The editors can also invite experts to publish Opinions about recent or controversy subjects.

2. Original research article

They are works resulting from scientific research data showing original findings of experience or observation, in studies with animals or human beings.

Format: The text of original research article is divided into Abstract (Portuguese and English), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgments and References.

Text: Manuscript should be typed single-spaced, maximum word length 30,000 characters (including title page, abstract, text, references, tables, ~~and~~ figure legends and spaces).

Maximum number of Tables: 6 (Excel ou Word)

Maximum number of Figures and Figure Legends: 8 (.tif or .gif)

Maximum number of References: 50

3. Review

This is a critical analysis of the current state of knowledge in any of the areas related to Physical Therapy. Literature review consists in analysis, synthesis and assessment of original papers already published in scientific journals. Preference will be given to systematic reviews, or, when impossible, the author should justify the choice for the methodology employed. Reviews will focus principally on topics of contemporary interest. Overviews of history, diagnostic strategies, and treatment approaches could be included.

Format: The review contains Abstract (Portuguese and English), Introduction, Methods, Results (divided in topics if necessary), Discussion, Conclusion and References.

Text: Manuscript should be typed single-spaced, maximum word length 30,000 characters (including title page, abstract, text, references, tables, ~~and~~ figure legends and spaces).

Maximum number of Tables: 6 (Excel ou Word)

Maximum number of Figures and Figure Legends: 8 (.tif or .gif)

Maximum number of References: 50

4. Case Report

Descriptive data of one or more clinical or treatment cases with similar characteristics. Only will be accepted reports of cases unusual, or rare diseases or changes with not expected evolution. The Case Report contains Abstract (Portuguese and English), Introduction, Case Report, Results, Discussion, Conclusion and References.

Text: Manuscript should be typed single-spaced, maximum word length 10,000 characters (including title page, abstract, text, references, tables, ~~and~~ figure legends and spaces).

Maximum number of Tables: 2 (Excel ou Word)

Maximum number of Figures and Figure Legends: 2 (.tif or .gif)

Maximum number of References: 20

5. Opinion

This section publishes short articles, which express the personal opinion of the authors: recent advances, health policy, new scientific ideas, critic of original studies and proposals for alternative interpretations, for example. The publication is subject to evaluation of the editors.

Format: The text of Opinions is free format, without abstract.

Text: 5.000 characters.

Figures and Tables: 1

References: 20

6. Letters

This section publishes correspondence received, necessarily related to articles published in PTB or to the editorial line of the Journal. Other contributions should be addressed to the Opinion section. The authors of articles cited in letters will be informed and will have right of reply, which will be published simultaneously. The publication is subject to evaluation of the editors.

General Preparation Instructions

Articles submitted must be typed in a text processor (Word), single-spaced, on page A4, formatted as follows: Times New Roman font size 12, with all the text formatting, such as bold, italics, superscript.

Tables (Word or Excel) should be numbered with Roman numerals, and Figures with Arabic numerals.

The images must be in black and white and with quality graphics resolution (300 dpi). Photos and illustrations must be scanned and sent in .tif, .gif or like slides of Power Point. Colorful images will be accepted exceptionally, when is essential to the understanding of the results (histology, neuroimaging, etc). Do not send figures in Photoshop (.psd), CorelDraw (.cdr), or locked and encrypted PDFs.

Use SI units of measure. A more conventionally used measurement may follow in parentheses. Make all conversions before manuscript submission.

Assemble the manuscript in this order: Title Page, Abstract, Text, Acknowledgments and Funding Sources, References, Figure Legends, Tables and Figures.

Title page

The title page contains the following elements:

- Full title in Portuguese and English
- Complete authors' names, academic degrees, and affiliations
- Name and complete address for correspondence, telephone number and email address

Abstract and key-words

- Use the following headings: Objective, Material and Methods, Results, Conclusion.
- Be concise (200 words maximum).
- Do not cite references in the abstract.
- Limit use of acronyms and abbreviations. Define at first use acronym or abbreviation in parenthesis.
- Insert three to five key-words after abstract. Please refer to the key word list of the Health Virtual Library in <http://decs.bvs.br>.

Text

- Typical main headings include Methods, Results, Discussion and Conclusion.
- Abbreviations must be defined at first mention.

Acknowledgments

Thanks to colleagues and funding sources should be inserted at the end of the article, before the References, in a separate section.

References

The literature references must follow the Vancouver style. The references must be numbered with Arabic numerals, the number mentioned in the text in brackets [], and listed in the order in which they appear in the text, following the standards of ICMJE.

The titles of journals are abbreviated according to the List of Journals Indexed in Index Medicus or with the list of Brazilian and Latin American journals, on the site of the Virtual Library of Health (www.bireme.br). Cite all authors to 6 authors. When more than 6, use the Latin abbreviation *et al.*

Exemples:

Phillips SJ, Hypertension and Stroke. In: Laragh JH, editor. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New-York: Raven Press; 1995.p.465-78.

Yamamoto M, Sawaya R, Mohanam S. Expression and localization of urokinase-type plasminogen activator receptor in human gliomas. *Cancer Res* 1994;54:5016-20.

(see complete specifications in www.atlanticaeditora.com.br or www.icmje.org)

How to submit a manuscript

The evaluation of the work, including the sending of cards of acceptance, lists of corrections, copies of the journal to the authors and pdf version of the work published, requires a fee of R\$ 150.00 to be deposited in the account of the Publisher: Atlantic Multimedia and Communications Ltd (ATMC) Banco do Brasil, agency 3114-3, account 5783-5. The journal's subscribers are exempted from payment of this fee (inform by e-mail with the sending of article).

All manuscripts should be sent by e-mail to the executive editor, Jean-Louis Peytavin, through e-mail: artigos@atlanticaeditora.com.br . The body of the e-mail should be a corresponding letter to the editor and should contain:

- Summary of no more than two sentences of the content of the article.
- One sentence ensuring that the content is original and has not been published in other media besides annals of Congress;
- One sentence in which the corresponding author takes responsibility for the content of the manuscript and ensures that all other authors are aware and according to the dispatch of the work;
- One sentence ensuring, when applicable, that all procedures and experiments with human beings or animals are in accordance with the standards in the institution and/or the Ethics Committee responsible;

- Phones of the corresponding author.
- The area of knowledge:

Cardiovascular / pulmonary function

Health Aging

Diagnosis kinetic-functional

Eletrothermophototerapy

Manual therapy

Ortheses, prostheses and equipment

Muscle-skeletal

Neuromuscular

Worker's Health

Control of pain

Experimental/basic research

Child's Health

Research Methodology

Man's health

Political, legislative and educational practice

Women's health

Public health

Other

Note: The article that is not in accordance with rules of publication in the Journal *Physical Therapy Brazil* will be returned to the corresponding author for formatting.