



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

**EDUARDO ERIKO TENÓRIO DE FRANÇA**

**EFEITO AGUDO DA CICLOERGOMETRIA PASSIVA E DA ESTIMULAÇÃO  
ELÉTRICA NEUROMUSCULAR SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E  
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES CRÍTICOS**

**Recife**  
**2017**

**EDUARDO ERIKO TENÓRIO DE FRANÇA**

**EFEITO AGUDO DA CICLOERGOMETRIA PASSIVA E DA ESTIMULAÇÃO  
ELÉTRICA NEUROMUSCULAR SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E  
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES CRÍTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde – LIKA do Centro de Ciências Bilógicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada a Saúde.

Orientador: Prof. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Coorientador: Prof. Dra. Maria do Amparo Andrade

**Recife  
2017**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**França, Eduardo Eriko Tenório de**

**Efeito agudo da cicloergometria passiva e da estimulação elétrica neuromuscular sobre o estresse oxidativo e citocinas inflamatórias em pacientes críticos/ Eduardo Eriko Tenório de França- Recife: O Autor, 2017.**

**94 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Célia Maria Machado Barbosa de Castro**

**Coorientadora: Maria do Amparo Andrade**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2016.**

**Inclui referências, apêndices e anexos**

- 1. Citocinas 2. Pacientes hospitalizados 3. Unidade de Tratamento Intensivo I. Castro, Célia Maria Machado Barbosa de (orientadora) II. Andrade, Maria do Amparo (coorientadora) III. Título**

**616.079**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2017-058**

**EDUARDO ERIKO TENÓRIO DE FRANÇA**

**EFEITO AGUDO DA CICLOERGOMETRIA PASSIVA E DA ESTIMULAÇÃO  
ELÉTRICA NEUROMUSCULAR SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E  
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES CRÍTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde – LIKA do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada a Saúde.

Aprovada em: 16/01/2017

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto/UFRPE

---

Profa. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro/UFPE

---

Profa. Dra. Livia Barboza de Andrade/FPS

---

Profa. Dra. Michele Maria Gonçalves Godoy/HC-UFPE

---

Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Aurujo/HC-UFPE

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais, irmãos, cunhados, sobrinhos, amigos, a minha amada esposa e aos meus amados filhos Arthur e Maria Eduarda com todo meu amor.*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que nunca me abandonou, sempre me deu muita força e iluminou meus caminhos;

À minha mãe **Jacira Tenório de França**, que dedicou sua vida toda em função dos filhos e teve a educação como sendo a prioridade para formar seus filhos cidadãos, ao meu pai **Manoel Antônio de França** que nunca foi de conversar com seus filhos, mas apenas com o seu olhar, sempre foi capaz de transmitir todos os seus ensinamentos e aos meus irmãos **Edna, Edeones, Bernadete, Everaldo, Evaldo, Edilma, Elyê e Edineide** pelo amor que sempre tiveram por mim e pelos seus ensinamentos transmitidos ao irmão mais novo;

À minha esposa **Luciana Braga**, por sempre me apoiar e incentivar na minha formação profissional, acreditar e estar sempre comigo, principalmente nos momentos mais difíceis. Obrigado por compartilhar comigo todos os sonhos de nossas vidas, simplesmente te amo. Aos meus lindos e amados filhos **Arthur e Maria Eduarda** que sempre trouxeram a alegria de viver e fazem com que os meus sonhos sejam alimentados dia a dia. Papai ama muito vocês;

À minha orientadora **Célia Castro**, que apesar de não me conhecer, acreditou em mim e me deu esta oportunidade que ficará marcada em minha vida. Cresci muito profissionalmente com todos os seus ensinamentos e as oportunidades que me foram confiadas, vai aqui toda minha estima que tenho pela senhora e o meu muito obrigado;

À minha coorientadora **Maria do Amparo**, pelo seu exemplo pessoal e profissional e pela oportunidade de me confiar e apresentar a minha orientadora. Muito obrigado por poder trabalhar junto com vocês que são acima de tudo pessoas corretas, honestas e de um coração gigantesco;

À todos os **professores do programa** do doutorado de Biologia Aplicada a Saúde do LIKA que transmitiram todos os seus conhecimentos durante o período que estive com vocês;

À todos os alunos da iniciação científica da UFPE e UNICAP (**Larissa, Joana, Rafaella, Manuela, Fernando, Marthely, Bárbara e Bruna**) que contribuíram muito, em todos os momentos com os experimentos laboratoriais, pois sem dúvida nenhuma, sem vocês este estudo não teria acontecido;

À **Thacianna**, aluna do doutorado que pode colaborar em todos os momentos da minha pesquisa, meu muito obrigado Thacianna;

Aos residentes de Fisioterapia Intensiva do Hospital Agamenon Magalhães (**Luana, Gabriela, Isabella, Thainá, Thamara e Adriano**) que foram imprescindíveis na seleção, coleta e desenho do estudo durante toda pesquisa, vai aqui meu eterno agradecimento a **TODOS** vocês;

A todos os **profissionais do Hospital Agamenon Magalhães**, meus amigos que contribuíram para eu alcançar este objetivo. Incluo aqui os amigos **João, Marçal Júnior, Ubiracé Elihimas, Mônica Oliveira, Claudia Manzi, Noel Loureiro, Francimar Ferrari e a TODOS os outros fisioterapeutas** que fazem parte da UTI Geral do HAM. Incluo também o meu amigo **Marco Valois** que foi imprescindível nesta reta final com a análise dos dados;

Aos colegas do Doutorado, por dividir os momentos de angustias e dificuldades e a todos os meus amigos que compartilharam essa conquista comigo. Essa foi uma importante e sonhada conquista não só minha, mas de muitos familiares, amigos e professores que participaram de alguma forma desse projeto.

Obrigado!

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria  
produção ou a sua construção”

Paulo Freire

## RESUMO

A fraqueza muscular adquirida na unidade de terapia intensiva (UTI) é um dos principais distúrbios que comprometem o paciente crítico. Acredita-se que a sinergia entre estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e o imobilismo, provoca ou acelera esta fraqueza muscular. A estimulação elétrica neuromuscular (EENM) e a cicloergometria passiva (CEP) visam à prevenção da hipotrofia e melhora funcional, favorecendo a redução da permanência na UTI, porém seus efeitos sobre estresse oxidativo e os parâmetros da resposta imune permanecem desconhecidos. O objetivo da tese foi analisar o efeito da EENM e da CEP sobre o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias em pacientes críticos. O trabalho de tese descreve um estudo randomizado, controlado em uma amostra de 35 pacientes de ambos os sexos que estavam sob ventilação mecânica e internados na UTI do Hospital Agamenom Magalhães. Os pacientes foram divididos em quatro grupos: grupo CEP (n = 9) - submetidos ao cicloergômetro passivo por 30 ciclos/min nos membros inferiores durante 20 minutos; grupo controle (n = 10) - não se submeteram a nenhuma intervenção terapêutica durante o estudo; grupo EENM (n = 9) - realizou somente a EENM no músculo quadríceps de ambos os membros por 20 minutos e o grupo EENM e CEP (n = 7): realizaram as duas intervenções, EENM e CEP. Foram analisados em 20 ml de sangue, os níveis séricos de óxido nítrico (ON) e algumas citocinas inflamatórias (Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucinas 6 (IL-6) e 10 (IL-10)) antes e após o protocolo do estudo. Em relação aos nossos resultados, nossas variáveis demográficas e clínicas entre os grupos foram homogêneos, o que possibilitou a comparação entre eles. A análise de ON mostrou redução significativa da produção do ON em células estimuladas após o uso da CEP (p < 0,001) e EENM (p < 0,05) em relação ao grupo controle. Para diferença entre a produção do ON, antes e depois do protocolo de estudo, na célula não estimulada, observamos uma redução significativa, apenas no grupo submetido a CEP (p < 0,001) comparado ao grupo controle. Quanto às citocinas inflamatórias, observou-se apenas uma redução significativa na concentração de TNF- $\alpha$ , comparando antes e após a aplicação do protocolo de estudo, no grupo submetido a CEP (p = 0,049) e para as outras citocinas inflamatórias não foram observadas diferenças nos outros quatro grupos. Podemos concluir que tanto a CEP como a EENM promoveram redução dos níveis de ON, mostrando efeitos benéficos na redução do estresse oxidativo. Com relação ao comportamento das citocinas, observou-se que a aplicação da CEP foi à única terapêutica capaz de reduzir a concentração de TNF- $\alpha$ , atuando na redução do processo inflamatório, comum em pacientes críticos.

**Palavras-chave:** Citocinas, estresse oxidativo, sistema musculoesquelético, unidade de terapia intensiva e estimulação elétrica nervosa transcutânea.

## ABSTRACT

The muscular weakness acquired in the intensive care unit (ICU) is one of the main disorders that compromise the critical patient. It is believed that the synergism between oxidative stress, inflammatory cytokines and immobilism, causes or accelerates this muscle weakness. Neuromuscular electrical stimulation (NMES) and passive cyclo ergometer (PCE) aim to prevent hypotrophy and functional improvement, favoring the reduction of ICU stay, however, its effects on oxidative stress and immune response parameters remain unknown. The objective of the thesis was to analyze the effect of the NMES and the CEP on oxidative stress and inflammatory cytokines in critically patients. The thesis work describes a randomized controlled trial in a sample 35 patients of both genders who were on mechanical ventilation and hospitalized in the ICU of the Hospital Agamenom Magalhães. The patients were divided into four groups: PCE group (n = 9) - underwent passive cyclo ergometer for 30 cycles/min on the lower limbs for 20 minutes; control group (n = 10) - did not undergo any therapeutic intervention during the study; NMES group (n = 9) - performed only the NMES in the quadriceps muscle of both limbs for 20 minutes and the NMES and PCE group (n = 7): they performed the two interventions, NMES and PCE. A total of 20 ml of blood was analysed, the nitric oxide (NO) serum levels and some inflammatory cytokines (Tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and interleukins 6 (IL-6) and 10 (IL-10)) were evaluated before and after the study protocol. Regarding our results, our demographic and clinical variables between the groups were homogeneous, which made it possible to compare them. To NO analysis revealed a significant reduction of this production of the NO in stimulated cells after the use of PCE ( $p < 0.001$ ) and NMES ( $p < 0.05$ ) compared to the control group. To the difference between the NO production, before and after the study protocol, in unstimulated cells, we observed a significant reduction, only in the group sampled to the PCE ( $p < 0.001$ ) compared to the control group. As for the inflammatory cytokines, we only observed a significant reduction in TNF- $\alpha$  concentration, comparing before and after the application of the study protocol, in the group submitted to PCE ( $p = 0.049$ ) and for the other inflammatory cytokines were not observed differences in the other four groups. We can conclude that both PCE and NMES promoted reduced levels of NO, showing beneficial effects on oxidative stress reduction. Regarding the behavior of cytokines, we observed that the application of PCE was the only therapy capable of reducing the concentration of TNF- $\alpha$ , acting in the reduction of the inflammatory process, common in critical patients.

**Keywords:** Cytokines, oxidative stress, musculoskeletal system, intensive care unit and transcutaneous electrical nerve stimulation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Imagem anterior de quadríceps femural pelo ultrassom de pacientes restritos ao leito. Na imagem observamos o reto femural (RF) e o vasto intermédio (VI), e a análise computadorizada.....	21
<b>Figura 2:</b> Fatores de riscos envolvidos na perda de massa muscular e na fraqueza adquirida na UTI. ....	24
<b>Figura 3:</b> Mecanismos de defesa e seus principais mediadores. ....	28
<b>Figura 4:</b> Resume o local (músculo) e interação sistêmica de citocinas. ....	30
<b>Figura 5A e 5B:</b> Decurso no tempo de citocinas próinflamatórias e antiinflamatórias na circulação sistêmica durante a doença crítica.....	31
<b>Figura 6:</b> GLUT4 no músculo esquelético detectado no sarcolema e túbulos T após a estimulação elétrica neuromuscular (EENM) intermitente (GLUT-4, vermelho; núcleos, azul). GLUT4 é exclusivamente embalado em torno de núcleos no músculo não estimulado. ....	33
<b>Figura 7:</b> Fluxo dos pacientes críticos que entraram no estudo. ....	37
<b>Figura 8:</b> Ilustração da aplicação da cicloergometria de membros inferiores em pacientes críticos sob VM. ....	43
<b>Figura 9:</b> Ilustração da aplicação da estimulação elétrica muscular no quadríceps em pacientes críticos sob VM. (quadríceps – reto femoral e vasto lateral).....	43
<b>Figura 10:</b> Diferença da produção do ON nos monócitos C+ dos quatro grupos estudados...	49
<b>Figura 11:</b> Diferença da produção ON nos momnócitos C- dos quatro grupos estudados. ....	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Descrição dos movimentos e graus de força avaliados pelo <i>escore</i> Medical Research Council (MRC). .....	25
<b>Tabela 2:</b> Variáveis demográficas e clínicas, motivos da admissão e comorbidades nos quatro grupos estudados. ....	46
<b>Tabela 3:</b> Hemograma com plaquetas avaliado antes e depois de uma hora do protocolo do estudo para os quatro grupos estudados. ....	47
<b>Tabela 4:</b> Produção do ON cultivado no monóxido, no C+ e C- avaliados nos instantes antes e depois dos quatro grupos. ....	48
<b>Tabela 5:</b> Valores das citocinas; TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10, avaliados nos instantes antes e depois dos quatro grupos estudados. ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	- Adenosina monofosfato que ativa a proteína kinase
APACHE II	- ( <i>Acute Physiology and Chronic Health Disease II</i> ) – Escore de gravidade utilizado em pacientes críticos
BH	- Balanço hídrico
BNM	- Bloqueador neuromuscular
C-	- Controle negativo
C+	- Controle positivo
C3a	- Sistema complemento 3a
C5a	- Sistema complemento 5a
CEP	- Cicloergometria passiva
CIM	- ( <i>Critical illness myopathy</i> ) – Miopatia de pacientes críticos
Cst sr	- Complacência do sistema respiratório
DPOC	- Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDET	- Estimulação diafragmática elétrica transcutânea
EDTA	- (Ethylenediamine tetraacetic acid) - Composto orgânico que age como agente quelante
EENM	- Estimulação elétrica neuromuscular
ERN	- Espécie reativa de nitrogênio
ERO	- Espécie reativa de oxigênio
FC	- Frequência cardíaca
FES	- ( <i>Functional electrical stimulation</i> ) – Estimulação elétrica funcional
FiO <sub>2</sub>	- Fração inspirada de oxigênio
FR	- Frequência respiratória
GLUT 4	- Transportador de glicose tipo 4
HAM	- Hospital Agamenon Magalhães
Hb	- Hemoglobina
HGT	- Hemoglicoteste
IFN- $\gamma$	- Interferon gama
IL-1	- Interleucina 1
IL-18	- Interleucina 18
IL-1R $\alpha$	- Interleucina 1 antagonista do receptor $\alpha$
IL-1 $\alpha$	- Interleucina 1 $\alpha$
IL-1 $\beta$	- Interleucina 1 $\beta$

IL-2	- Interleucina 2
IL-6	- Interleucina 6
IMC	- Índice de massa corpórea
IMS	- ( <i>ICU Mobility Scale</i> ) – Escala de mobilidade usada na UCI
LIKA	- Laboratório de Imunologia Keizo Azami
LPS	- Lipopolissacarídeo
MRC	- ( <i>Medical Research Council</i> ) – Escore de força muscular periférica
NF-k	- Fator Nuclear kappa
ON	- Óxido nítrico
PAD	- Pressão arterial diastólica
PAS	- Pressão arterial sistólica
PBMC	( <i>Peripheral blood mononuclear cell</i> ) - É qualquer célula sanguínea periférica com um núcleo redondo
PCR	- Proteína C reativa
PFIT	- ( <i>Physical Function ICU Test</i> ) – Teste de função física usado na UCI
RASS	- ( <i>Richmond Agitation-Sedation Scale</i> ) – Escala de agitação e sedação
RNA <sub>m</sub>	- RNA mensageiro
R <sub>sr</sub>	- Resistência do sistema respiratório
SpO <sub>2</sub>	- Saturação periférica de oxigênio
SPSS	- ( <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> ) - É um software aplicativo (programa de computador) do tipo científico
T	- Tempo
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TH	- ( <i>T help</i> ) – Linfócito T auxiliar
TNF- $\alpha$	- ( <i>Tumor Necrosis Factor alfa</i> ) - Fator de necrose tumoral $\alpha$
TNF- $\beta$	- ( <i>Tumor Necrosis Factor beta</i> ) - Fator de necrose tumoral $\beta$
UCI	- Unidade de cuidados intensivos
UFPE	- Universidade Federal de Pernambuco
UTI	- Unidade de terapia intensiva
VIDD	- Disfunção diafragmática induzida pelo ventilador
VM	- Ventilação mecânica

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 HIPÓTESE .....	18
1.2 OBJETIVOS.....	19
1.2.1 Objetivo geral.....	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
1.3 ESTRUTURA DA TESE .....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
2.1 INATIVIDADE E DISFUNÇÃO MUSCULAR .....	21
2.2 SEPSE INDUZINDO A FRAQUEZA MUSCULAR ADQUIRIDA NA UTI: DESEQUILÍBRIO PROTEICO.....	22
2.3 PERDA DE EXCITABILIDADE MUSCULAR: ASPECTOS BIOQUÍMICOS.....	25
2.4 INFLUÊNCIA DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E O ESTRESSE OXIDATIVO NA SARCOPENIA ..	27
2.4.1 Sistema imune e as citocinas.....	27
2.4.2 Citocinas e doença crítica.....	29
2.5 FISIOTERAPIA COMO FORMA DE TRATAMENTO DA FRAQUEZA MUSCULAR ADQUIRIDA NA UTI .....	32
<b>3 MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO .....	36
3.2 DESENHO E POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	37
3.3 TAMANHO DA AMOSTRA.....	37
3.4 MÉTODOS E TÉCNICAS DE INVESTIGAÇÃO.....	38
3.4.1 Critérios de inclusão.....	38
3.4.2 Critérios de exclusão .....	38
3.4.3 Critérios de descontinuação .....	38
3.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	39
3.5.1 Variáveis dependentes.....	39
3.5.2 Variáveis independentes.....	39
3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS .....	39
3.7 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO .....	40
3.7.1 Hemograma com plaquetas .....	40
3.7.2 Estresse oxidativo .....	41
3.7.3 Parâmetros da resposta imune .....	41
3.8 PROTOCOLO DO ESTUDO .....	42

3.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	44
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
<b>APÊNDICES E ANEXOS.....</b>	<b>68</b>
<b>APÊNDICE A: FICHA DE AVALIAÇÃO PARA INSERÇÃO NO PROTOCOLO DO ESTUDO.....</b>	<b>69</b>
<b>APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>73</b>
<b>APÊNDICE C: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A fraqueza muscular está cada vez mais freqüente em pacientes críticos que necessitam de ventilação mecânica (VM) por período prolongado. Essa disfunção grave do sistema osteomioarticular está associada à doença subjacente, aos efeitos adversos de medicamentos e ao período prolongado de imobilização. (CHIANG et al., 2006; DE JONGHE et al., 2007). Os prejuízos na função muscular variam de uma diminuição diária de força de 1,3 a 3% e de 10% no período de uma semana de imobilidade (TOPP et al., 2002). A restrição ao leito pode determinar alterações estruturais das fibras musculares a partir de 4 horas de imobilização, proporcionando redução do tamanho do sarcômero, diminuição das fibras musculares e da força contráctil total do músculo (KASPER et al., 2002).

Estudos eletrofisiológicos dos membros revelam anormalidades neuromusculares difusas em 50% dos pacientes internados na unidade de terapia intensiva (UTI) após 5 a 7 dias de VM, tendo como principal sinal clínico a redução da capacidade funcional, devido à fraqueza muscular (DE JONGHE et al. 2007).

A imobilização no leito e o maior tempo de dependência da VM podem afetar adversamente diversos órgãos e sistemas, apresentando as seguintes consequências: contraturas musculares; perda funcional global; redução do consumo máximo de oxigênio; fraqueza muscular adquirida na UTI; trombose venosa profunda; úlceras por pressão; pneumonia; atelectasia; desmineralização óssea e alterações do estado emocional, como ansiedade, apatia, depressão e labilidade emocional. A inatividade durante a restrição ao leito resulta ainda em redução da massa óssea, aumento na excreção do cálcio, alteração do balanço eletrolítico necessário para função muscular normal, diminuição da sensibilidade à insulina, hiperglicemia e injúria dos nervos periféricos (DE JONGHE et al., 2002).

Os fatores etiológicos da fraqueza muscular servem como base para os termos utilizados como definição da polineuropatia e miopatia do doente crítico. No entanto, essas nomenclaturas se apresentam de forma confusa devido à incerteza das causas da doença. Por isso, o termo “fraqueza muscular adquirida na UTI” parece ser o mais apropriado. Várias pesquisas demonstram que a sepse e a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, associada a um longo período de imobilização, em pacientes críticos são uns dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da paresia adquirida na UTI (DE JONGHE et al., 2002; NAVA et al., 2002).

Esta fraqueza muscular tão comum em pacientes críticos, também ocorre com

frequência em pacientes com falência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e durante o envelhecimento. Essa disfunção está associada a uma desregulação inflamatória que parece contribuir para o aparecimento da miopatia. O mecanismo para o decaimento muscular devido à imobilidade ainda não foi completamente esclarecido, acredita-se que o sinergismo entre estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e o imobilismo, cause ou acelere a atrofia muscular (MADOR, 2001; DUSCHA et al., 2002).

O estresse oxidativo através das espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são capazes de causar dano oxidativo no DNA, nos lipídeos e proteínas, sendo assim, um dos responsáveis pela disfunção e degradação muscular. Vários agentes oxidantes podem contribuir para o dano inflamatório do músculo. São exemplos das ERO, os radicais hidroxila e superóxido, e das ERN, o óxido nítrico (ON) e nitritos e nitratos (WINKELMAN, 2007; BARREIROS et al., 2006).

Pacientes críticos são vulneráveis para síntese de agentes oxidantes e redução de agentes antioxidantes, o que favorecerá o aparecimento do estresse oxidativo aumentando a oxidação celular, tendo um papel importante no processo fisiopatológico da disfunção muscular. As espécies reativas proporcionam peroxidação lipídica, uma vez que levam a liberação de toxinas e derivados do ácido araquidônico que danificam a membrana celular, inativando os receptores e as enzimas de membrana e levam a alterações da resposta química iônica. Nos miócitos, este processo de degradação pode ser modificado por numerosos sinais intracelulares, incluindo a ativação do fator nuclear kappa (NF-k). Produtos da destruição celular pela ERO produzem um *feedback* positivo, gerando mais ERRO, ao mesmo tempo, a interação entre as espécies reativas com as citocinas e outras moléculas intercelulares, está associada à degradação muscular (LI Y-P, 1998).

Assim como o estresse oxidativo, algumas citocinas proinflamatórias também influenciam na disfunção e degradação muscular em pacientes críticos. Em um modelo para explicar a caquexia, Reid (2001) sugeriram que há interação entre a ERO e citocinas proinflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), sendo indicativo de um *feedback* patológico positivo, que faz baixar a regulação da reparação do tecido muscular danificado. Assim, não é simplesmente a supressão direta da atividade muscular que leva à disfunção na presença de TNF- $\alpha$ , mas um decréscimo da reparação e/ou incremento da apoptose que resultam no enfraquecimento muscular mediados por esta citocina proinflamatória (REID, 2001).

Diversas pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de prevenir os efeitos deletérios da fraqueza muscular adquirida na UTI ou minimizá-la, como alternativa

terapêutica. Dentre os procedimentos preconizados, destacam-se a mobilização passiva e/ou exercícios ativos, a aplicação da estimulação elétrica neuromuscular (EENM), a suspensão diária da sedação e a redução da infusão de medicamentos como bloqueadores neuromusculares (BMN) e corticoesteróides, a manutenção da homeostase dos eletrólitos e adequado aporte nutricional (BAX et al., 2005).

A reabilitação de pacientes críticos vem sendo bem estabelecida com crescente aceitação, como meio de aliviar os sintomas e melhorar a função, independente do estágio da doença (PERME et al., 2006). Atualmente, já existem padrões de orientações para o exercício físico desses pacientes críticos. Estes padrões seguem níveis de mobilização que podem variar desde um exercício passivo até a deambulação na UTI. Seguindo estes níveis de mobilização, tanto os exercícios passivos quanto a aplicação da EENM, proporcionam contração muscular sem que haja aumento do trabalho cardiovascular permitindo que pacientes com insuficiência ventilatória grave tolerem esse tipo de treinamento muscular. O objetivo geral desse treinamento é melhorar a função das propriedades musculares, o fluxo sanguíneo intramuscular, a produção de força máxima e *endurance*, através de repetidas contrações prevenindo assim a atrofia muscular (MORRIS et al., 2008).

Os efeitos da cicloergometria passiva (CEP) e da EENM sobre pacientes críticos na prevenção do hipotrofismo e melhora da força muscular com consequente redução do tempo de internamento na UTI e melhora funcional, têm se expandido rapidamente nos últimos anos. No entanto, seus efeitos sobre os parâmetros da resposta imune e o estresse oxidativo destes pacientes ainda não são bem definidos, sendo necessários estudos que elucidem esses efeitos, o que, justifica a realização desta pesquisa tornando possível uma melhor compreensão acerca do comportamento isolado da CEP e da EENM e sua associação em pacientes críticos.

## 1.1 HIPÓTESE

Qual o impacto da CEP, considerada uma atividade física de baixa intensidade e da EENM sobre o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias em pacientes críticos?

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Analisar o efeito agudo da CEP através do cicloergômetro de membros inferiores e da EENM de quadríceps sobre o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias de pacientes críticos.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- a. Avaliar as alterações hematológicas evidenciadas através do hemograma antes e depois da realização da CEP e da EENM em pacientes críticos;
- b. Analisar alterações de parâmetros da resposta imune através da quantificação dos níveis de ON produzidos por monócitos do sobrenadante da cultura celular, antes e após a realização da CEP e da EENM em pacientes críticos;
- c. Analisar alterações de parâmetros da resposta imune através da quantificação dos níveis das citocinas (TNF- $\alpha$ , interleucina 6 (IL-6) e 10 (IL-10) e interferon gama (IFN- $\gamma$ )) do sangue, antes e após a realização da CEP e da EENM em pacientes críticos.

## 1.3 ESTRUTURA DA TESE

A tese compõe-se dos seguintes capítulos principais: introdução, revisão da literatura, métodos, resultados, discussão e considerações finais. No capítulo, revisão de literatura foi realizada uma revisão narrativa sobre: a inatividade e disfunção muscular; sepse induzindo a fraqueza muscular adquirida na UTI: desequilíbrio proteico; perda de excitabilidade contribuindo para disfunção muscular: aspectos bioquímicos; influência das citocinas inflamatórias e estresse oxidativo na sarcopenia e fisioterapia como forma de tratamento da fraqueza muscular adquirida na UTI. Para o desenvolvimento desse capítulo foram utilizadas as bases de dados Scopus, Pubmed/Medline e Bireme, com os seguintes *MEsh Terms*, esses isolados ou associados: *Cytokines, oxidative stress, musculoskeletal system, intensive care unit and transcutaneous electrical nerve stimulation*. Os artigos cujos resumos apresentassem

coerência com os objetos a serem estudados para desenvolver este documento foram selecionados.

O capítulo de métodos foi estruturado da seguinte forma; o local e período do estudo, o desenho do estudo, a população do estudo, o tamanho amostral, os critérios de inclusão, exclusão e descontinuação, parâmetros de avaliação, obtenção das células do sangue que foi dividida em duas fases, (fase I - descreve a análise do hemograma com plaquetas e a fase II – os parâmetros da resposta imune através das citocinas inflamatórias a análise do estresse oxidativo), o desenho do protocolo do estudo e o processamento e análise dos dados.

O capítulo seguinte dos resultados apresentou a descrição dos dados por meio de tabelas e figuras. Após o capítulo de resultados, foi apresentado o capítulo de discussão, no qual foram discutidos os resultados à luz da literatura científica atual sobre o tema. No capítulo de considerações finais, foram apresentadas as conclusões do estudo e propostas para estudos futuros.

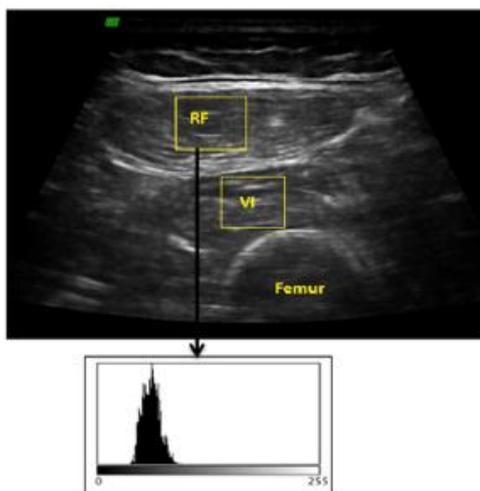
Os resultados aqui expostos até o presente momento deram origem a dois artigos, sendo que o primeiro serviu de base para padronização dos parâmetros da técnica de EENM utilizados no estudo, intitulado: “*Effects of electrical muscle stimulation early in the quadriceps and tibialis anterior muscle of critically ill patients*”, publicado *Physiotherapy Theory and Practice* (**Anexo A**) e o segundo que apresentou a análise dos resultados de dois dos quatro grupos estudados, grupo exercício físico e controle, através da análise do estresse oxidativo e dos parâmetros da resposta imune após o uso da cicloergometria em pacientes críticos, intitulado “*Oxidative stress analysis and immune system after use of cycle ergometer in critical patients*”, aceito pelo periódico *Clinics* em dezembro de 2016 e o mês considerado pela revista para publicação, março de 2017 (**Anexo B**).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 INATIVIDADE E DISFUNÇÃO MUSCULAR

A restrição ao leito e a dependência da VM durante a fase aguda da doença crítica são fatores altamente sugestivos para a contribuição da fraqueza e a atrofia muscular. Além disso, o uso de sedativos e analgésicos relaciona-se diretamente com o tempo de despertar e, portanto, afetam o período de imobilismo no leito. Não podemos atribuir isoladamente à falta de uso da musculatura esquelética, como fator isolado sobre os efeitos de perda de massa e função muscular durante a estadia na UTI (TOPP et al., 2002).

Ao se comparar a avaliação por imagem através de ultrassonografia a beira do leito do grupamento muscular do quadríceps (figura 1) com a avaliação funcional após a alta hospitalar, sugere-se que uma maior perda na espessura e qualidade do músculo nos primeiros 10 dias de internamento sejam suficientes para um pior desempenho nas provas de função muscular (*escore do Medical Research Council - MRC, Physical Function ICU Test*) (PFIT) e *ICU Mobility Scale*) (IMS) (PARRY et al., 2015). Foi observada uma perda de cerca de 10% da força muscular em indivíduos saudáveis submetidos a uma semana de imobilismo no leito (TOPP et al., 2002). É difícil mensurar isoladamente o papel de cada fator desencadeante da fraqueza muscular do paciente crítico, levando a se acreditar que a doença é decorrente de diversos fatores que atuam em conjunto, contribuindo para todas essas alterações fisiopatológicas da disfunção muscular.



**Figura 1:** Imagem anterior de quadríceps femoral pelo ultrassom de pacientes restritos ao leito. Na imagem observamos o reto femoral (RF) e o vasto intermédio (VI), e a análise computadorizada.

**Fonte:** (PARRY et al., 2015).

A falta de uso da musculatura esquelética irá inicialmente mudar a conformação das suas fibras, onde músculos com predominância de fibras de contração lenta (tipo I) tendem a diferenciar sua conformação para fibras de contração rápida (tipo II). Já as fibras do tipo II, com a falta de ativação, perderão mais rapidamente sua espessura, além da necrose tecidual e substituição de tecido muscular por adiposo e fibrose. O tecido muscular é um dos mais moldáveis no corpo humano, sendo influenciado diretamente pelo uso e desuso, sofrendo alterações no diâmetro, qualidade e tipos das suas fibras musculares (BIERBRAUER et al., 2012; GRUTHER et al., 2008).

A disfunção muscular ocasionada pelo imobilismo no leito vai muito além dos efeitos diretos na fibra do músculo. Uma série de mudanças cardiovasculares, pulmonares, na composição corpórea e no sistema nervoso central pode ter sua origem decorrente da simples restrição prolongada no leito. Esse imobilismo proporcionará uma diminuição de volume sanguíneo plasmático, com redução do volume de ejeção sistólico e aumento da frequência cardíaca (FC). Em seguida, o fluxo sanguíneo será diminuído nas extremidades, com o objetivo de nutrir órgãos vitais, diminuindo a capacidade de transporte de energia para a musculatura periférica. Além disso, o adequado suprimento de oxigênio será comprometido pelas perdas de volumes e capacidades pulmonares decorrentes da restrição ao leito, de eventuais atelectasias e possíveis pneumonias associadas à VM. Somam-se ainda outros fatores como, o aumento da excreção de cálcio e o desbalanço dos eletrólitos, com redução da massa óssea, como também a diminuição na nutrição articular, resultando em contraturas e posturas muitas vezes irreversíveis. Observam-se também lesões da inervação periférica, diminuição da excitabilidade e consequente fraqueza muscular. O *delirium* e a desorientação também estão presentes em pacientes restritos ao leito, contribuindo para a dependência e a inabilidade para manterem-se de pé e deambular (WINKELMAN, 2007).

## 2.2 SEPSE INDUZINDO A FRAQUEZA MUSCULAR ADQUIRIDA NA UTI: DESEQUILÍBRIO PROTEICO

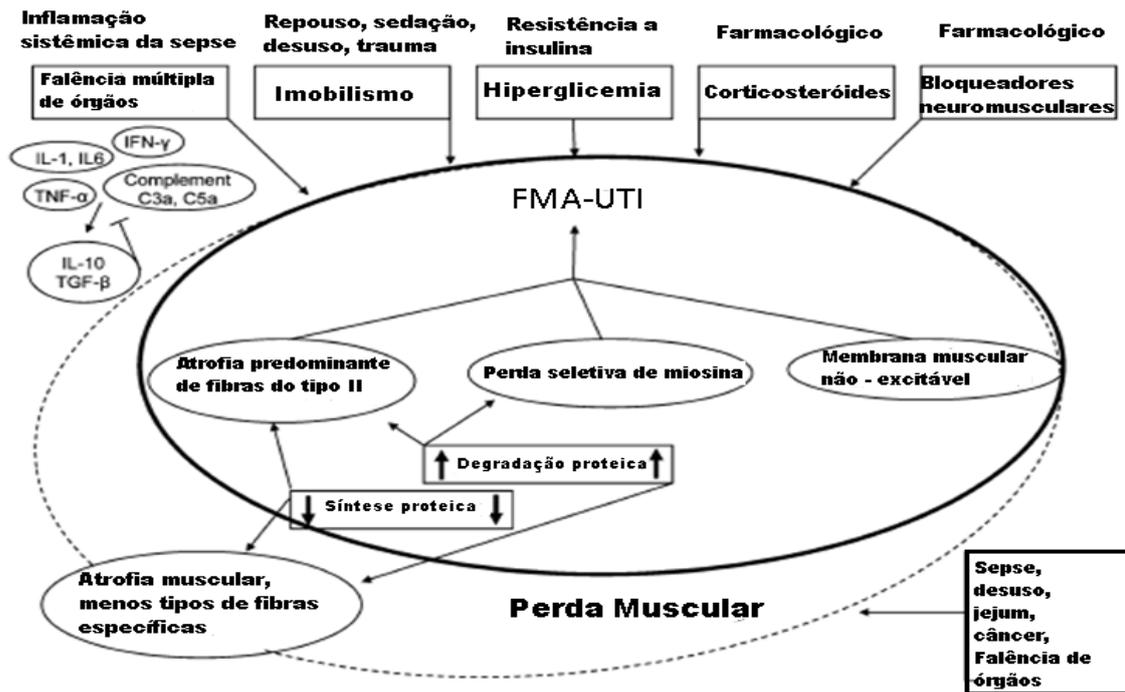
A sepse grave e o choque séptico são um grande problema da saúde pública, já que afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Semelhante a outras patologias, como o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular encefálico, a velocidade e a adequação do tratamento administrado nas horas iniciais após o desenvolvimento da sepse grave tendem a influenciar diretamente o prognóstico do paciente (DELLINGER et al., 2013).

Fisiopatologicamente, a primeira resposta a uma infecção grave consiste na ativação do sistema imunológico, através da liberação de citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-6 e interleucina 1 (IL-1), compostos do sistema complemento (C3a e C5a) e ERO. Também ocorrerá liberação de mediadores antiinflamatórios (Interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ )) (SCHEFOLD et al., 2010).

Todas estas alterações imunológicas causadas pela sepse, somadas a vários outros fatores, dos quais o paciente crítico está exposto na UTI, como uso de corticoesteróides, sedativos, bloqueador neuromuscular (BNM), restrição ao leito e disglícemia podem levar a atrofia e perda de força muscular. Além disso, podem ser detectados em pacientes criticamente doentes, a diminuição da excitabilidade elétrica muscular, significativa perda de miosina, desorganização dos sarcômeros, prejuízo na autofagia e volume proteico. Essas alterações se devem a um desequilíbrio no metabolismo proteico, com um predomínio da proteólise em detrimento a síntese dessas proteínas (Figura 2) (SCHEFOLD et al., 2010; FRIEDRICH et al., 2015).

O processo de atrofia muscular recebe forte influência da inibição da síntese proteica, preferencialmente com inibição da síntese da proteína miofibrilar e sarcoplasmática de músculos de contração rápida. Em contrapartida, a via ubiquitina-proteossoma, mostra-se como um importante mecanismo de regulação da proteólise, com um direcionamento seletivo para degradação de proteínas estruturais e regulatórias. O sistema lisossomal, calpaínas e caspases também tem sido associado à lise proteica e consequente atrofia muscular (FRIEDRICH et al., 2015).

Todas estas alterações na unidade motora, sem etiologia plausível e sem estar relacionada à outra doença grave, recebe o nome de fraqueza muscular adquirida na UTI e pode ser caracterizada por uma fraqueza simétrica com maior acometimento em membros inferiores e musculatura respiratória, preservação da musculatura inervada pelos nervos cranianos, com reflexos tendinosos normais, diminuídos ou ausentes. Além disso, a sensibilidade pode estar alterada ou preservada (SCHEFOLD et al., 2010; FRIEDRICH et al., 2015).



**Figura 2:** Fatores de riscos envolvidos na perda de massa muscular e na fraqueza adquirida na UTI.

**Fonte:** (SCHEFOLD et al., 2010) modificado.

**Definição das abreviações:** FMA-UTI = fraqueza muscular adquirida na unidade de terapia intensiva.

O surgimento de fraqueza muscular adquirida na UTI vem se mostrando estar associado a um mecanismo complexo, que envolve alterações estruturais e funcionais na musculatura esquelética, sistema nervoso periférico ou ambos. O prognóstico anátomo-funcional estará diretamente relacionado à severidade da doença crítica (FRIEDRICH et al., 2015; KRAYCHETE et al., 2006).

A fraqueza muscular adquirida na UTI pode ser avaliada de maneira fácil e prática a beira do leito através do *escore* de MRC que avalia o grau de força muscular para movimentar as três principais articulações de membros superiores e inferiores. Cada movimento articular pontuará no mínimo zero e no máximo cinco, com pontuação máxima para todas as articulações de membros superiores e inferiores de 60, considerado um MRC normal (Tabela 1) e o teste de prensão palmar, onde valores abaixo de 48 para o *escore* de MRC e de 7Kg/força para mulheres e 11 Kg/força para homens na força de prensão palmar já são indicativos dessa fraqueza (ALI et al., 2008). De Jongue et al. (2007), mostraram que o *escore* de MRC < 48 está relacionado ao aumento do tempo de desmame da VM, de dias de internamento na UTI e hospitalar.

Tanto o *escore* de MRC como o teste de prensão palmar apenas apontam para a fraqueza muscular, mas não fornecem informações sobre o processo fisiopatológico

subjacente. Além disso, há um retardo de diagnóstico em alguns pacientes, tendo em vista, a impossibilidade de realizar estes testes quando os mesmos se encontram não colaborativos ou sem adequado nível de consciência. A ultrassonografia vem surgindo como uma nova e promissora técnica que permite a identificação de mudanças na estrutura e morfologia muscular podendo ser realizada à beira do leito e sem necessidade de colaboração do paciente (PARRY et al., 2015). Outro meio de diagnóstico é a eletroneuromiografia, mas esta requer a interpretação de um especialista e não é um método disponível para todas as UTIs (ALI et al., 2008).

**Tabela 1:** Descrição dos movimentos e graus de força avaliados pelo *escore* Medical Research Council (MRC).  
**Fonte:** (BITTNER et al., 2009) modificado.

MOVIMENTOS AVALIADOS	GRAU DE FORÇA MUSCULAR
Abdução de ombro	0= Nenhuma contração visível
Flexão do cotovelo	1= Contração visível sem movimento do segmento
Extensão do punho	2= Movimento ativo com eliminação da gravidade
Flexão de quadril	3= Movimento contra a gravidade
Extensão do joelho	4= Movimento ativo contra a gravidade e resistência
Dorsiflexão do tornozelo	5= Força normal

### 2.3 PERDA DE EXCITABILIDADE MUSCULAR: ASPECTOS BIOQUÍMICOS

Vários mecanismos biomoleculares contribuem para o desenvolvimento de fraqueza muscular durante a doença crítica, dos quais ganham destaque: redução da excitabilidade neuromuscular; canalopatia iônica; alteração da homeostase do íon cálcio, perturbação da relação anabolismo e catabolismo; fracasso bioenergético e falha da transmissão neuromuscular. Não se sabe se estes mecanismos desenvolvem simultaneamente ou de forma independente (FRIEDRICH et al., 2015).

O doente crítico, muitas vezes se depara com distúrbios na microcirculação, diminuição do suprimento sanguíneo para o componente musculoesquelético, além de edema tissular. Citologicamente, observa-se atrofia e diminuição das fibras musculares, edema mitocondrial e axonal, cuja compressão gera dano inespecífico no compartimento músculo-nervo, especialmente os axônios distais localizados na fáscia muscular. A migração das células de defesa para o meio extravascular e sua infiltração no tecido podem fornecer as bases para os efeitos específicos dos mediadores inflamatórios, tanto no músculo, quanto no

nervo. A falta do adequado suprimento sanguíneo irá resultar em um processo de degeneração dos axônios e desnervação. Neste caso, o músculo será impossibilitado de realizar uma contração voluntária ou até evocada, e o prognóstico do doente será pior. Estes fatores são responsáveis pela diminuição e por vezes, pela perda da excitabilidade muscular no paciente crítico, no entanto, outros aspectos bioquímicos foram observados em outros estudos (FRIEDRICH et al., 2015; DIAZ et al, 1998).

O uso de BNM está geralmente associado com a disfunção da excitabilidade muscular a longo prazo. O mecanismo de ação deste fármaco ocorre na junção neuromuscular. A depressão da contração gerada pelos BNM no paciente em sepse ocorre predominantemente por bloqueio competitivo de receptores de acetilcolina pósjuncionais. A utilização prolongada pode gerar uma hipossensibilidade ao BNM, por diminuição dos receptores de acetilcolina (FRIEDRICH et al., 2015).

Os canais de sódio regulados por voltagem na membrana celular são importantes para o início da propagação do potencial de ação. Este será gerado pelo influxo através do canal aberto durante a despolarização da membrana. Tanto a ativação quanto a inativação do estado estável dos canais modulam as propriedades de excitabilidade e potencial de ação do músculo esquelético. Quando ocorre um processo inflamatório exacerbado, haverá um desbalanço iônico, gerando alterações neste estado, desde o sarcolema até os gradientes de concentração que influenciam o potencial de difusibilidade. Na fase aguda da doença crítica o músculo se torna inexcitável, através da diminuição da velocidade de condução da fibra nervosa, aumento do período refratário relativo e diminuição da excitabilidade das fibras em resposta a estimulação direta do músculo (FRIEDRICH et al., 2015; ALLEN et al. 2008).

Dentre as canalopatias responsáveis pela perda de força muscular, o mecanismo dos canais de sódio é o mais conhecido. No entanto, em pacientes críticos, que são expostos a uma das variáveis da síndrome da doença crítica, vários sistemas estão alterados, assim como, o balanço iônico do potássio, sódio e cloreto no plasma, e a força osmótica do fluido extracelular ao redor das fibras musculares. Sabe-se que os canais de cálcio dependentes de voltagem têm relação direta com a contração muscular e é provável que haja uma alteração nesse mecanismo, sobretudo na contratilidade cardíaca, embora poucos estudos tenham comprovado tal fato. Especialmente durante a sepse, ocorre uma alteração da homeostase do cálcio na membrana celular, com conseqüente diminuição da sensibilidade ao cálcio nas miofibrilas, tanto em musculatura esquelética quanto cardíaca, o que sugere a relação entre a canalopatia do cálcio e a doença crítica (KRANER et al. 2011; SUPINSKI et al. 2009).

O aumento da fadiga tem sido repetidamente documentado em pacientes com condições inflamatórias crônicas exacerbadas, sendo um fenômeno um tanto quanto complexo, e envolvem determinados fatores, como a falha de transmissão de potenciais de ação, falha na propagação de excitação ao túbulo T, desregulação do sensor de voltagem, alteração na liberação de cálcio, comprometimento metabólico através de depleção de ATP e de proteínas nas miofibrilas (FRIEDRICH et al., 2015).

## 2.4 INFLUÊNCIA DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E O ESTRESSE OXIDATIVO NA SARCOPENIA

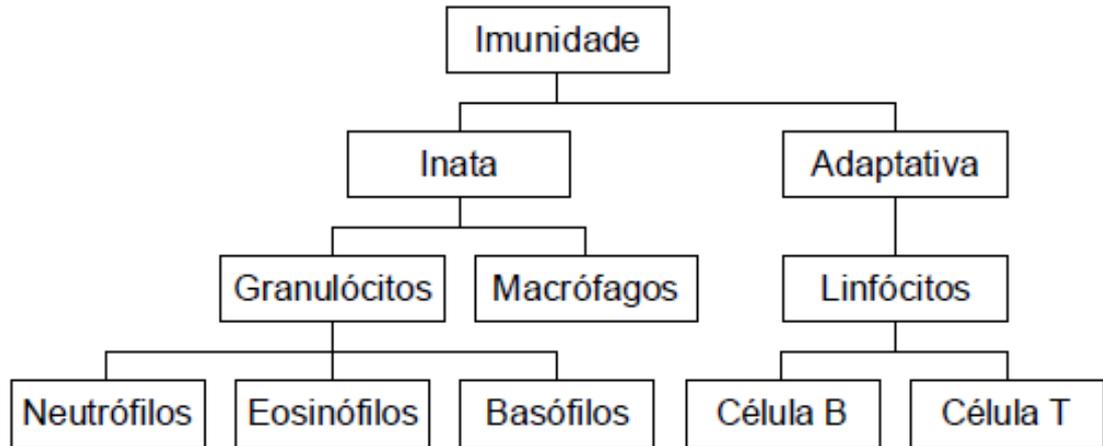
### 2.4.1 Sistema imune e as citocinas

O sistema imune é o principal sistema de defesa do hospedeiro contra a infecção. Além das infecções, este pode ser estimulado por outras situações que provocam estresse à homeostasia orgânica, como ocorre durante o exercício. A resposta imune pode ocorrer através de dois tipos de sistemas: inato e adaptativo. O sistema inato desencadeia uma resposta rápida e efetiva, gerando uma resposta imune constante ao longo da vida de um indivíduo. Já o sistema adaptativo desenvolve uma resposta igualmente eficaz, porém mais, lenta, específica e duradoura. Ambos os sistemas dependem da atividade das células brancas, ou leucócitos (ROSA et al. 2002; BAIN et al., 2003).

As principais células da resposta imune inata são liberadas imediatamente, são elas: macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos. Os macrófagos e neutrófilos possuem capacidade de ingerir e digerir vários microorganismos, sendo os neutrófilos os elementos celulares mais numerosos e importantes. Outra função dos macrófagos é de apresentar antígenos a outras células. Já os mastócitos apresentam núcleos contendo grânulos citoplasmáticos preenchidos com elementos químicos (enzimas). Os eosinófilos são importantes principalmente na defesa contra infecções por parasitas, e a função dos basófilos ainda não é bem conhecida (Figura 3) (JANEWAY et al., 2000).

Uma resposta imune específica, como a produção de anticorpos a um determinado agente infeccioso ou estresse, é conhecida como uma resposta imune adaptativa. Os anticorpos são produzidos pelos linfócitos que são capazes de reconhecer e eliminar os agentes patogênicos, proporcionando imunidade duradoura. A grande maioria dos linfócitos encontra-se em estado inativo e possuem atividade quando houver algum tipo de interação com um estímulo antigênico, necessário para a ativação e proliferação linfocitária. Existem dois tipos principais de linfócitos: linfócitos B e T, que expressam em suas superfícies

receptores de antígeno específicos para um dado determinante antigênico (ROSA et al. 2002; BAIN et al., 2003; JANEWAY et al., 2000).



**Figura 3:** Mecanismos de defesa e seus principais mediadores.  
**Fonte:** (CASTRO, 2001).

As citocinas são polipeptídios, secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa, em resposta a microrganismos e outros antígenos. Elas possuem diversas atividades, sendo as principais: mediação de respostas imunes e inflamatórias, atuação sobre vários tipos de células e atuação sobre processos de síntese do RNA mensageiro (RNAm) (FRIEDRICH et al., 2015; KRAYCHETE et al., 2006).

As interleucinas, monocinas e linfocinas são os principais tipos de citocinas. As interleucinas constituem um grupo de proteínas diferentes, com origens diversas, a maioria em células T, com atuação em células-alvo e efeitos específicos sobre cada alvo. As atividades das interleucinas podem ser resumidas em: reconhecimento de antígenos estranhos por células T, amplificação da proliferação de células T ativadas, atração de macrófagos e identificação de mecanismos efetivos para fagocitose de microrganismos, como a promoção de glóbulos vermelhos (eritropoese) (ROSA et al., 2002; BAIN et al., 2003; JANEWAY et al., 2000).

São 20 tipos de interleucinas que são identificadas por números: IL-1, interleucina – 2 (IL-2). Dentre estas, as que exercem maior atuação na doença crítica são: IL-1, IL-6 e IL-10. A IL-1 é produzida por monócitos e macrófagos, exercendo como principal função a de ser mediadora da inflamação já que desenvolve efeito sobre o endotélio, leucócitos e fibroblastos. No endotélio, ela induz várias mudanças, a maioria relacionada à transcrição de gene para síntese de moléculas de adesão endotelial, mediadores químicos (citocinas, fator de crescimento e ON), produção de enzimas associadas à remodelação de células matrizes e aumento na superfície trombogênica do endotélio. Outra função de destaque é a liberação de

TNF que estimulará os linfócitos T a produzirem anticorpos específicos. A TNF é uma citocina, importante mediadora da resposta inflamatória aguda a bactérias Gram-negativas e outros microorganismos infecciosos, sendo responsável por muitas das complicações sistêmicas de infecções graves. Também chamado de TNF- $\alpha$  para diferir da TNF- $\beta$  uma linfotóxina (ROSA et al., 2002; BAIN et al., 2003; JANEWAY et al., 2000).

A IL-6 é potente na atividade antiviral, com grande atuação como reposta imunológica durante a fase aguda de uma infecção. Ela atua no estímulo da unidade formadora de colônias de granulócitos-macrófagos e na célula-tronco. Já a IL-10 é uma citocina antiinflamatória secretada pelos linfócitos T auxiliares (TH), que regula a resposta imune, inibindo reações alérgicas (ROSA et al., 2002; BAIN et al., 2003; JANEWAY et al., 2000).

A ação das citocinas pode ser local ou sistêmica e se inicia pela sua ligação a receptores específicos na membrana das células-alvo. A maioria das citocinas age perto de onde elas são produzidas, na mesma célula que a secreta, sendo chamado de ação autócrina. Entretanto, elas podem agir em uma célula próxima, ação parácrina, ou entrarem na corrente sanguínea e atuarem a distância do local de produção, ação endócrina (ROSA et al., 2002; BAIN et al., 2003; JANEWAY et al., 2000).

#### 2.4.2 Citocinas e doença crítica

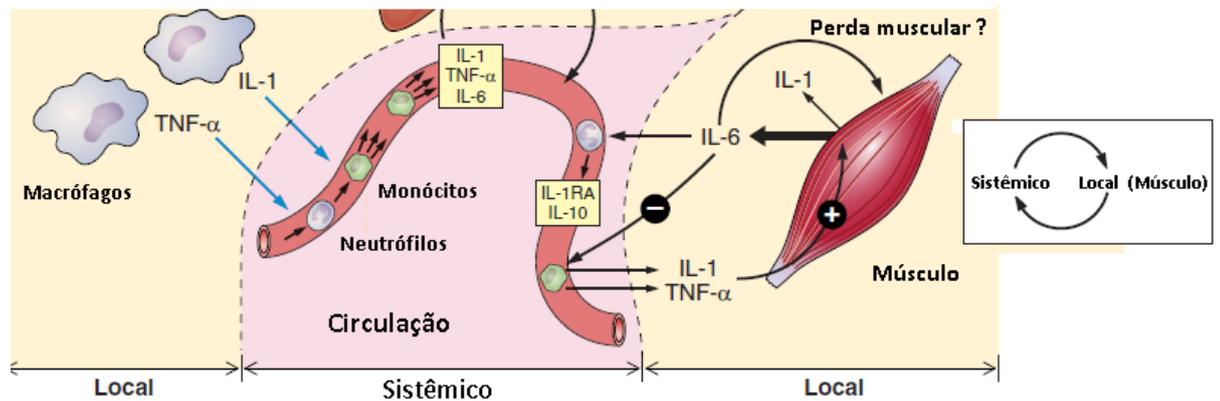
Diante de uma infecção grave, o paciente crítico tende a criar respostas na tentativa de acelerar as reações enzimáticas defensivas, reduzir a replicação de patógenos, aumentar a proliferação de células imune e conservar energia. Isto ocorrerá com o reconhecimento de receptores e pela liberação das citocinas e radicais livres. O importante é o reconhecimento do papel-chave das citocinas, como a TNF- $\alpha$ , as interleucinas, IL-6 e IL-1, e os fatores complemento, C3a e C5a, mediadores inflamatórios liberados pela resposta imune numa primeira reação à doença (SCHEFOLD et al., 2010).

Com o surgimento dos primeiros sinais clínicos da infecção, haverá uma regulação positiva da citocina antiinflamatória, a IL-10. Esta reação poderá levar a estados hipoinflamatórios, a chamada imunoparalisia, que está diretamente ligada a uma infecção secundária, aumentando a estadia do doente na UTI e, conseqüentemente, a mortalidade (SCHEFOLD et al., 2010).

Além da sepse, as citocinas inflamatórias e o estresse oxidativo têm sido investigados como causas potenciais para miopatia durante a doença crítica, isto porque existem hipóteses de que a atrofia seja acelerada ou agravada pela sinergia entre estresse oxidativo, citocinas e

inatividade (SCHEFOLD et al., 2010; WINKELMAN, 2007). Portanto, de forma geral, podemos dizer que o aumento do TNF- $\alpha$  promove fraqueza muscular através de dois principais mecanismos: promoção da atrofia e indução da disfunção contrátil (FRIEDRICH et al., 2015; REID et al., 2001).

Além do TNF- $\alpha$ , outras citocinas atuam no eixo de inflamação do músculo durante a doença crítica. Como pode ser visto na figura 4 os macrófagos ativados no tecido inflamado secretam grandes quantidades de citocinas próinflamatórias como IL-1 e TNF- $\alpha$  que dirige a resposta pró-inflamatória sistêmica. Estes mediadores também são estimulados na miosina do músculo esquelético. Entretanto, na miosina a IL-6 é o mais predominante inibindo ainda mais a liberação de IL-1 e TNF- $\alpha$  e estimulando a produção de IL-10 e interleucina 1 antagonista do receptor alfa (IL-1 R $\alpha$ ) (FRIEDRICH et al., 2015).

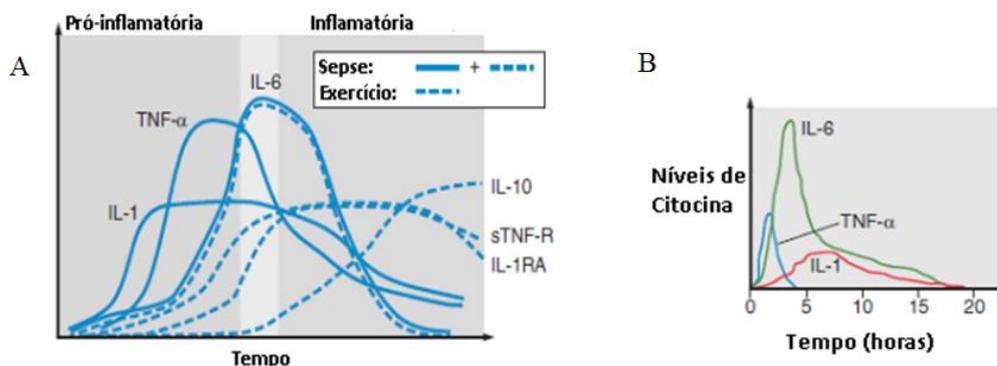


**Figura 4:** Resume o local (músculo) e interação sistêmica de citocinas.  
**Fonte:** (FRIEDRICH et al., 2015) modificado.

Em indivíduos saudáveis, incrementos na TNF- $\alpha$  são variáveis em resposta ao exercício. Há algumas indicações de que o TNF- $\alpha$  é maior quando o estresse oxidativo está presente durante o exercício. Níveis séricos de TNF- $\alpha$  também reduzem os níveis de antioxidantes em alguns músculos esqueléticos. A IL-1 é uma superfamília com quatro ligantes relacionados: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-1R $\alpha$ . A IL-1R $\alpha$  age como uma molécula inibidora, antagonizando os efeitos inflamatórios da IL-1. Já a IL-18 contribui para a indução da ERO, do TNF- $\alpha$  e outras moléculas próinflamatórias, incluindo IFN- $\gamma$ . A ação biológica da IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são semelhantes, mas somente a IL-1 $\beta$  é excretada pela vascularização, sendo a mais provável para mediar à inflamação sistêmica. (DINARELLO, 2005). Como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  é uma citocina próinflamatória, que estimula a síntese de vários fatores, incluindo enzimas que produzem prostaglandinas, moléculas de adesão, ON e ERO (WINKELMAN, 2007).

Na figura 4, observamos outra citocina muito importante neste processo inflamatório é a IL-6 que tem uma ampla gama de atividade biológica. Ela é sintetizada pelas células do sistema imunológico e pelas células do músculo esquelético, adipócitos, células endoteliais e células do epitélio intestinal (FINK et al., 2006).

Durante a sepse e o exercício, ocorre um aumento inicial de citocinas pró-inflamatórias de IL-1 e TNF- $\alpha$ , seguida por um aumento nos níveis de IL-6 que exerce tanto efeito, próinflamatório como antiinflamatório. Além das propriedades proinflamatórias, altos níveis de IL-6 agem para estimular o aparecimento de citocinas antiinflamatórias no plasma, incluindo IL-10 e IL-1R $\alpha$ . (Figura 5A). O pico de ação das citocinas ocorre nas primeiras 5 horas, sendo o efeito da TNF- $\alpha$  o mais curto, quando comparado a IL-6 e IL-1, que estão presentes no plasma até mais de 15 horas após o início de sua liberação. (Figura 5B). Essa atuação mais curta deve-se ao fato de a IL-6 derivada do músculo reduzir a produção de TNF- $\alpha$ , interrompendo a degradação do músculo por meio de destruição da miosina (FRIEDRICH et al., 2015).



**Figura 5A e 5B:** Decurso no tempo de citocinas próinflamatórias e antiinflamatórias na circulação sistêmica durante a doença crítica.

**Fonte:**(FRIEDRICH et al., 2015) modificado.

Depois do exercício, altos níveis circulantes de IL-6 são seguidos por aumento da produção de IL-10. Estudos sugerem que o exercício faça com que haja uma ação antiinflamatória através da indução de IL-10 e IL-6 e inibição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Os mensageiros celulares, IL-6 e IL-10, estão implicados na manutenção da função muscular durante o alongamento e alguns tipos de exercício. O exercício físico é explorado como um agente regulador da inflamação e da função muscular. A verdade é que importantes implicações clínicas tem sido demonstradas, sendo o exercício físico e a estimulação elétrica funcional (*Functional Electrical Stimulation*) (FES) umas das principais formas de prevenção

na função muscular do paciente crítico (WINKELMAN et al., 2007).

## 2.5 FISIOTERAPIA COMO FORMA DE TRATAMENTO DA FRAQUEZA MUSCULAR ADQUIRIDA NA UTI

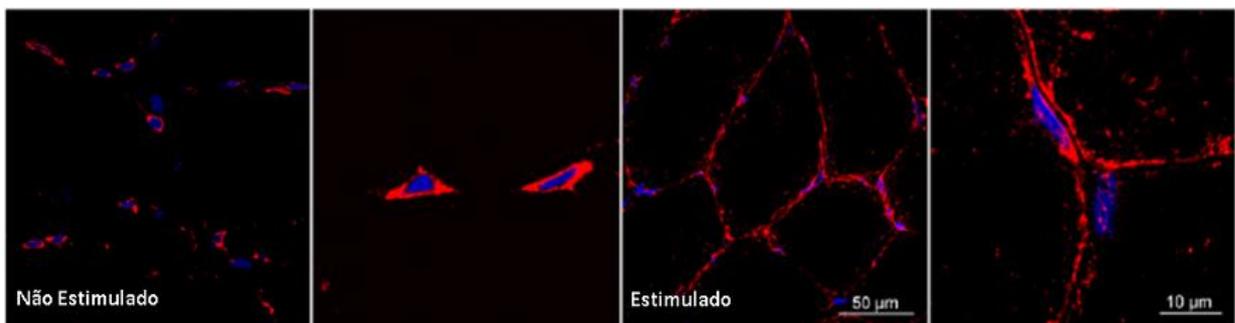
A doença crítica, associada ao imobilismo e a todo o processo inflamatório decorrente, causa uma série de consequências que poderão deixar sequelas em diferentes níveis nos pacientes. A fraqueza muscular acarretará não somente redução nos níveis funcionais destes pacientes, mas o aumento no tempo de VM, de internamento hospitalar e, conseqüentemente, aumento da mortalidade. Ao longo dos anos, buscaram-se alternativas para amenizar os efeitos devastadores da doença crítica no sistema musculoesquelético. A fisioterapia tem papel primordial na prevenção e recuperação da quantidade e qualidade da funcionalidade do músculo do doente crítico. A funcionalidade do músculo deve ser mantida, através da contração muscular, do controle postural e de exercícios. Entretanto, quando se fala em paciente de terapia intensiva, a janela de tempo entre a admissão e a colaboração do doente para realizar exercícios ativos pode ser muito grande, proporcionando lesões graves e até irreversíveis (DE JONGUE et al., 2007; NEMET et al., 2002).

A EENM vem ganhando espaço na UTI já que cada vez mais estudos mostram seu impacto sobre a prevenção da fraqueza muscular adquirida na UTI através da diminuição da atrofia muscular, melhoria da excitabilidade da membrana, capacidade de mudar a conformação da fibra muscular, aumento da atividade da enzima oxidativa e regeneração do nervo periférico de pacientes criticamente enfermos (SILLEN et al., 2013; XU et al., 2014). Outro importante benefício da EENM é que esta pode ser iniciada imediatamente após a admissão na UTI, facilitando a progressão da mobilização de maneira mais rápida, já que pode ser implementada ainda na fase mais aguda da doença crítica e com o paciente sedado (GEROVASILI et al., 2009; STRASSER et al., 2009).

Benefícios agudos sobre a circulação sistêmica logo após uma aplicação EENM têm sido demonstrados por estudos recentes através da melhora da perfusão em tecidos musculares à distância do grupamento muscular eletroestimulado. Evidências mais recentes, também demonstram que a EENM pode promover a mobilização de células progenitoras do endotélio em pacientes críticos sépticos, independente do estado séptico do paciente. A mobilização destas células em resposta a EENM podem expressar um potencial efeito benéfico sobre a função endotelial no paciente crítico, uma vez que a mobilização das células

progenitoras do endotélio está associada com regeneração endotelial e o processo de neovascularização no músculo lesionado pelo processo inflamatório associado à sepse (STEFANOEU et al., 2016; ANGELOPOULOS et al., 2013; GEROVASILI et al., 2009).

Outro aspecto a ser considerado é o aumento dos níveis de glicose no plasma, achado típico em pacientes com sepse grave e choque séptico, além disso, a imobilidade parece promover falha na ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), já que na fase mais aguda da doença crítica estes pacientes precisam estar sedados e com analgésicos. Desta forma, o exercício físico e a EENM surgem como as principais formas de preservação da função muscular do paciente crítico, podendo influenciar na captação de glicose. Isso foi evidenciado por Weber-Carstens et al. (2013) que observaram que a contração muscular gerada pela EENM teve impacto sobre a ativação da AMPK, sendo observado aumento AMPK na musculatura eletroestimulada quando comparado com o membro contralateral não eletroestimulado. Associado, o transportador de glicose regulado por insulina (GLUT 4) pode ser facilmente detectado no sarcolema e túbulos T dos músculos estimulados, enquanto que nos músculos do membro contralateral não foram observadas a presença de GLUT4 nos espaços perinucleares (Figura 6) (WEBER-CARSTENS et al., 2013).



**Figura 6:** GLUT4 no músculo esquelético detectado no sarcolema e túbulos T após a estimulação elétrica neuromuscular (EENM) intermitente (GLUT-4, vermelho; núcleos, azul). GLUT4 é exclusivamente embalado em torno de núcleos no músculo não estimulado.

**Fonte:** (WEBER-CARSTENS et al., 2013).

As fibras do tipo II são as mais afetadas pela miopatia em paciente crítico (*Critical Illness Myopathy – CIM*) devido ao seu metabolismo glicolítico. Neste mesmo estudo foi observado ainda melhora do diâmetro da área de secção transversa das fibras do tipo II dos músculos vasto lateral e medial eletroestimulados, sendo mantidos os tamanhos das fibras de tipo I (WEBER-CARSTENS et al., 2013).

Sendo assim, a eletroterapia pode influenciar de maneira significativa na captação de glicose e na prevenção da CIM já que pode diminuir a degradação de proteínas do músculo,

influenciar a restauração da fosforilação da AMPK e, conseqüente, melhorar a translocação de GLUT4 e metabolismo glicolítico (WEBER-CARSTENS et al., 2013).

Além da Eletroterapia, a mobilização precoce tem mostrado resultados promissores na UTI. Scweickert et al. (2009), relataram que pacientes submetidos a um protocolo de mobilização precoce eram mais frequentemente capazes de sair do leito e, ocasionalmente, deambular com assistência durante o período de UTI e VM, comparados com os submetidos aos regimes de fisioterapia padrão que tiveram maior comprometimento funcional e necessitavam de um maior tempo de recuperação. Além disso, a mobilização precoce apresentou impacto positivo sobre o *delírium* na UTI, já que se observou menor duração destes nos pacientes submetidos à mobilização (SCHWEICKERT et al., 2009).

Em outro estudo, os mesmos pesquisadores, verificaram em uma análise de regressão logística, que a mobilização precoce e a insulino terapia intensiva foram capazes de diminuir a chances de desenvolvimento da fraqueza muscular adquirida na UTI, independentemente da presença de outros fatores de risco para fraqueza. Além disso, o grupo que recebeu mobilização precoce, também diminuiu significativamente a necessidade de administração de insulina para manter a mesma meta glicêmica, quando comparada ao grupo não mobilizado. Diante deste achado, os autores sugerem que um programa de mobilização precoce e sistematizado, além de melhorar a funcionalidade e ser um fator de proteção da fraqueza muscular adquirida na UTI, pode ser proposto como uma alternativa terapêutica eficiente para manter o controle glicêmico do paciente crítico exposto a VM (BHAKTI et al., 2014).

Akar et al. (2015), estudando pacientes com DPOC submetidos à VM cujo objetivo foi investigar o impacto da mobilização ativa e da EENM no processo de desmame, alta hospitalar e mediadores inflamatórios. Eles estudaram 30 pacientes divididos em três grupos, contendo 10 em cada grupo: grupo 1 – submetido a mobilização ativa de extremidades e EENM, grupo 2 – submetido apenas EENM e grupo 3 – apenas mobilização ativa de extremidades, sendo estas intervenções realizadas 5 dias por semana, totalizando 20 sessões. Eles observaram melhora na força muscular periférica, principalmente de extremidades de membros inferiores, nos grupos que realizaram EENM e exercícios e EENM exclusivamente (AKAR et al., 2015). Com relação aos níveis da proteína C reativa (PCR) foi observada redução no grupo 2, sendo também observada redução nos valores de IL-6 no grupo 1 e IL-8 no grupo 1 e 2. Com isso, os autores concluíram que a EENM sozinha e associada à mobilização ativa parece apresentar melhores resultados, quando comparado a mobilização ativa isoladamente, para prevenir e fortalecer a musculatura de extremidades de pacientes com exacerbação aguda de DPOC e insuficiência respiratória na UTI. Apesar dos resultados

promissores, poucos estudos abordam esta temática, sendo necessárias, pesquisas futuras para obtenção resultados mais conclusivos sobre os efeitos da eletroterapia e dos exercícios em relação ao sistema imune quando empregados em pacientes críticos (AKAR et al., 2015).

A fraqueza adquirida na UTI, não atinge apenas a musculatura periférica, mas também gera perda de força da musculatura respiratória, provocando como consequência, maior tempo de VM e maior número de dias de internação em UTI e no hospital. Quando identificada a fraqueza muscular diafragmática em pacientes submetidos à VM, o treinamento muscular respiratório é realizado com o intuito de acelerar o processo de desmame da VM e minimizar os riscos de falha de extubação por fadiga muscular. Além disso, ventilar com modos espontâneos deve ser priorizado o quanto antes, a fim de prevenir a disfunção diafragmática induzida pela ventilação (VIDD). Outro modo de prevenir e tratar a VIDD que tem surgido na literatura, mas ainda com poucas evidências, é a estimulação diafragmática elétrica transcutânea (EDET), que tem mostrado resultados satisfatórios no ganho de força muscular diafragmática, avaliada através da manovacuometria (CANCELLIERO et al., 2012).

### 3 MÉTODOS

O estudo foi dividido em duas fases. Fase I, o pesquisador frequentava a UTI diariamente no período da manhã, onde fazia uma triagem com o objetivo de identificar se o paciente preenchia os critérios de inclusão para entrar na pesquisa. Uma vez preenchido os critérios para iniciar no estudo, o pesquisador fazia uma avaliação através dos registros médicos, das informações demográficas, da história clínica, do diagnóstico, calculava o valor do índice de massa corpórea (IMC), que é o valor do peso sobre a altura ao quadrado e avaliava ainda a utilização de corticoesteróides, BNM, sedativos e drogas vasoativas. Essas informações foram repassadas para a ficha de avaliação para inserção no protocolo do estudo, **Apêndice A**. Em seguida, os critérios de exclusão foram levados em consideração para fazer com que os indivíduos pudessem ou não ser randomizados para iniciar o protocolo de estudo. A Fase II teve por objetivo randomizar os pacientes selecionados em um dos quatro grupos estudados. O fluxo dos pacientes críticos que entraram no estudo está disposto na figura 7.

#### 3.1 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

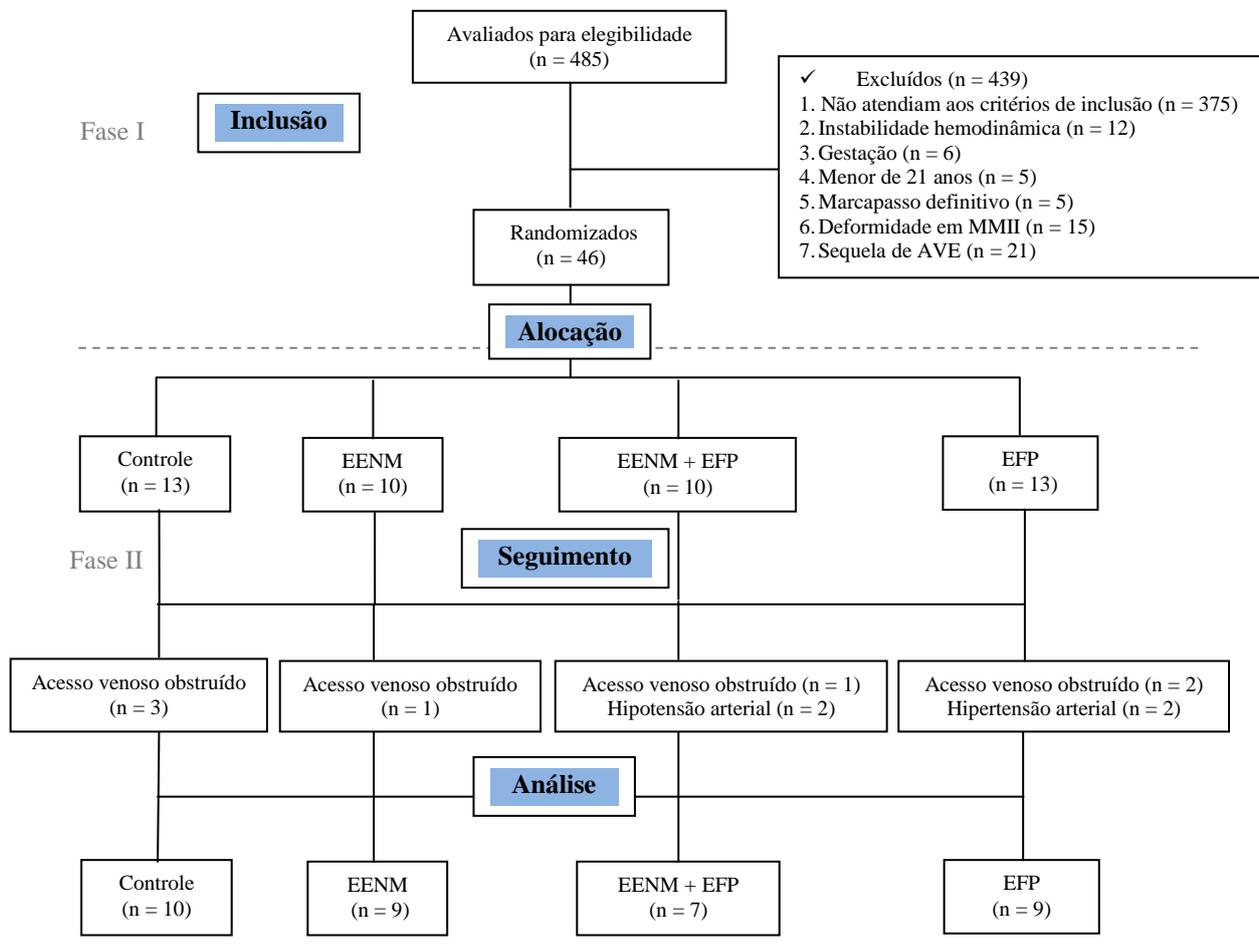
O estudo foi realizado na UTI geral do Hospital Agamenon Magalhães (HAM) durante o período de dezembro de 2013 a fevereiro de 2016. Neste período foram internados 485 pacientes portadores de patologias de etiologias diversas que foram submetidos à VM, dos quais 439 entraram nos critérios de exclusão do estudo e apenas 46 pacientes foram incluídos na pesquisa. A ordem de entrada nos grupos foi realizada aleatoriamente por meio do programa WinPepi (PEPI-for-Windows), porém 11 desses pacientes, não conseguiram terminar suas análises, pois apresentaram critérios para descontinuação na pesquisa. Portanto, apenas 35 pacientes finalizaram suas análises, sendo distribuídos da seguinte forma: grupo controle (n = 10) - pacientes que não realizavam nenhum tipo de intervenção terapêutica apenas no momento de realização do protocolo do estudo, grupo EENM (n = 9) - pacientes submetidos à EENM do músculo quadríceps, grupo CEP (n = 9) - pacientes que só realizavam a CEP de membros inferiores e por último, grupo EENM e CEP (n = 7) - pacientes submetidos a EENM e a CEP de membros inferiores, uma seguida da outra, porém a escolha da primeira das duas intervenções a ser realizada foi feita de forma aleatória pelo *software Statistical Package for the Social Sciences-SPSS 18.0* (Figura 7).

### 3.2 DESENHO E POPULAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um ensaio clínico controlado e randomizado, com pacientes internados na UTI geral do HAM que estiveram sob VM, onde os responsáveis legais pelos pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participação na pesquisa. O termo de consentimento está descrito no **Apêndice B**.

### 3.3 TAMANHO DA AMOSTRA

Para ser capaz de encontrar o tamanho da amostra, foi realizado o cálculo amostral pelo programa WinPepi (PEPI-for-Windows) onde foram considerados os seguintes critérios: intervalo de confiança de 95% e erro amostral de cinco pontos percentuais. Considerando o número total de 485 pacientes que foram para VM neste período, avaliados na primeira fase da pesquisa e que apenas 2% destes pacientes fazem a EENM ou mobilização passiva com o cicloergômetro de membros inferiores (AMIDEI et al., 2013), sendo levada em consideração, uma perda amostral de 40%, foi totalizada uma amostra mínima de 48 pacientes.



**Figura 7:** Fluxo dos pacientes críticos que entraram no estudo.

### 3.4 MÉTODOS E TÉCNICAS DE INVESTIGAÇÃO

#### 3.4.1 Critérios de inclusão

Fizeram parte do estudo, os pacientes submetidos à VM que apresentaram uma boa reserva cardiovascular, demonstrada por uma variabilidade  $< 20\%$  da FC de repouso, pressão arterial sistólica (PAS)  $< 180$  mmHg ou  $> 90$  mmHg, eletrocardiograma normal e sem evidências de infarto agudo do miocárdio ou arritmias; boa reserva respiratória, demonstrada pela saturação periférica de oxigênio (SpO<sub>2</sub>)  $> 90\%$  e fração inspirada de oxigênio (FiO<sub>2</sub>)  $< 60\%$ , sem sinais de desconforto respiratório e frequência respiratória (FR)  $< 25$  ipm e parâmetros clínicos laboratoriais favoráveis, demonstrados por uma concentração da hemoglobina (Hb)  $> 7$  gramas/dL, temperatura (T)  $< 38^{\circ}\text{C}$ , contagem de plaquetas  $> 20.000$  célls/mm<sup>3</sup> (STILLER et al., 2007).

#### 3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentaram: incapacidade de andar sem assistência antes doença aguda na UTI, menores de 21 anos, gestantes, pacientes com índice de massa corpórea (IMC)  $> 35$  Kg/m<sup>2</sup>, doença neuromuscular e vascular previamente diagnosticada, histórico de acidente vascular encefálico, lesões na pele no lugar da colocação do eletrodo, fratura não consolidada e utilização de marcapasso cardíaco.

#### 3.4.3 Critérios de descontinuação

Alguns pacientes, mesmo depois da randomização foram excluídos da pesquisa, pois apresentaram sinais de hipotensão ou hipertensão arterial, ou mesmo, tiveram seu acesso venoso obstruído por coágulo, o que impossibilitava a coleta do sangue e a continuidade na pesquisa.

### 3.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO

#### 3.5.1 Variáveis dependentes

Com o objetivo de avaliar os efeitos da EENM e da CEP de membros inferiores em pacientes críticos, as variáveis dependentes foram os efeitos destas intervenções sobre o óxido nítrico, as citocinas inflamatórias e o hemograma.

#### 3.5.2 Variáveis independentes

A análise de fatores associados às alterações no estresse oxidativo e nos parâmetros da resposta imune e hematológicos, incluiu as seguintes variáveis: idade, altura, peso, IMC, escala de avaliação da gravidade de pacientes críticos, chamado *escore* de (*Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II*) (APACHE II), escala de sedação de (*Richmond Agitation-Sedation Scale*) (RASS), tempo de VM e de internamento na UTI que os pacientes tinham antes de iniciar o protocolo do estudo. Outras variáveis independentes foram os grupos aos quais os pacientes fizeram parte do estudo, sendo eles; grupo controle, grupo EENM, grupo CEP e grupo EENM e CEP.

### 3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram processados e analisados utilizando o *software GraphPad Prism 4 e Microsoft Office Excel 2007*. A apresentação das variáveis mensuradas foi realizada por meio de tabelas e figuras, incluindo o uso de algumas medidas descritivas, como números absolutos e relativos, média e desvio padrão e mediana e percentil 25-75%. Para testar a suposição de normalidade das variáveis envolvidas no estudo foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. As análises comparativas entre os quatro grupos foram realizadas utilizando-se o teste one-way ANOVA. Para comparar antes e depois de cada grupo foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Já as comparações das análises antes e depois do ON existentes entre os grupos avaliados foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

### 3.7 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

Terminada a avaliação inicial, os pacientes elegíveis para o estudo foram submetidos à coleta de 20ml de sangue venoso, através de seu acesso venoso, antes e depois de uma hora do protocolo de estudo para cada grupo estudado, exceto para o grupo controle que tiveram duas coletas de sangue com um intervalo de uma hora, sem que houvesse nenhuma intervenção entre elas. Esses 20ml de sangue foram distribuídos em 5 tubos de 4ml a vácuo (Vacutainer®, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil) contendo EDTA dipotássico, sendo que desses 5 tubos, dois foram utilizados para avaliação do hemograma e três para análise do estresse oxidativo e citocinas inflamatórias.

Foram destinados ao laboratório do próprio hospital, 2 tubos de 4ml de sangue que serviram para análise do hemograma com plaquetas, descrito pelo método abaixo:

#### 3.7.1 Hemograma com plaquetas

A série branca e vermelha e as plaquetas tiveram suas análises realizadas através da automatização das avaliações células do sangue, aliada a programas de informática. O método utilizado foi o de impedância elétrica. Neste método, um volume constante de solução constituída de sangue e diluente passa através de um orifício, onde ocorre a passagem de corrente elétrica, provocando um aumento da impedância elétrica à medida que cada célula passa pelo campo, sendo que esse aumento é proporcional ao volume celular. Assim, as células são contadas a partir dos impulsos elétricos gerados por elas.

Os outros três tubos de 4ml de sangue foram transportados pelo pesquisador em um recipiente refrigerado até o setor de Microbiologia do Laboratório de Imunologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde foram utilizados para diluição em um tubo falco de 10ml da amostra de sangue do paciente sendo realizada a análise do estresse oxidativo, através da contagem da produção do ON, encontrado na célula (monócito) e dos parâmetros da resposta imune, através das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10, avaliadas por contagem no plasma.

### 3.7.2 Estresse oxidativo

Obtenção de monócitos a partir do sangue periférico: Os monócitos foram obtidos a partir de 10 dos 12ml de sangue provenientes do acesso do sangue venoso do paciente, com EDTA. O sangue obtido foi diluído na proporção de 1:2 na solução tampão de PBS, estéril, à temperatura ambiente de 22 °C a 25 °C (10ml de sangue + 10ml de PBS). Aos 20 ml da suspensão foram adicionados 10 ml de histopaque (1077 – SIGMA) e todo o conteúdo foi centrifugado por 30 minutos a 1.600 rpm (25 °C). Logo após, o plasma foi aspirado e, então, coletada a camada formada pelas células mononucleares periféricas sanguíneas (PBMC) que foi transferida para outro tubo de ensaio. A mesma quantidade do aspirado de PBS foi adicionada e centrifugados por 15 minutos nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 1ml do meio de cultura RPMI 1640 completo, contendo 3% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml). Dessa suspensão foi feita a contagem na câmara de Neubauer acrescentando-se a alíquota da suspensão de células e o corante azul tripan na diluição 1:10. Esse corante foi usado para fazer a contagem das células e avaliar a sua viabilidade. A partir da contagem foi padronizada a concentração de  $1 \times 10^6$  células para cada 1ml de meio de cultura.

Produção de óxido nítrico (ON) em monócitos cultivados e tratados com lipopolissacarídeo (LPS) de E. coli: Em cada grupo a concentração foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células em 1ml de meio de cultura em cada poço da placa. Em seguida, as células foram tratadas na dose de 10 µg/ml de LPS por 24 horas. A avaliação da liberação de ON foi realizada utilizando-se o método de GRIESS. Em seguida, foram adicionados 50µl do reagente de GRIESS (1g de sulfanilamide, Sigma 9251; 0,1g de N-(Naphthyl) Ethylenediamine Dihydrochloride – Sigma 5889; 2,5ml de ácido fosfórico PA e água destilada qsp 100 ml). A placa foi incubada por 10 minutos ao abrigo da luz. A leitura foi realizada a 540 nm em leitor de Elisa (Dynatech MR 5000). O limiar de sensibilidade do teste foi de 1,56 µM.

### 3.7.3 Parâmetros da resposta imune

Quantificação da IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ:

Os níveis séricos de IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ foram determinados pela técnica de ELISA, com a utilização kits comerciais de ELISA para IL-6, IL-10, IFN-γ (Invitrogen,

Manufacturing Site Invitrogen, Camarillo, Califórnia, USA) e TNF- $\alpha$  (BioSource®, TNF- $\alpha$  EASIA, Nivelles, Belgium, Europe) de acordo com as instruções do fabricante. Nessa técnica, um anticorpo monoclonal específico foi adsorvido à placa. Após adição da amostra de soro na qual se encontrava o mediador a ser dosado, procedeu-se à incubação, ocasião em que as moléculas de antígenos se fixaram aos anticorpos adsorvidos à placa. Por meio de lavagem, todo o material não fixado foi eliminado. A seguir, foi adicionado novo anticorpo, com especificidade para um determinante antigênico ligado à placa, obtendo-se o complexo Ac-Ag-Ac-enzima (técnica do sanduíche). Nova lavagem foi feita para remoção dos anticorpos não ligados. A seguir, foi acrescentado ao substrato que tem a propriedade de, quando em contato com a enzima, assumir coloração diferente, proporcional à quantidade de mediador presente na amostra (antígeno). A leitura foi feita em leitora de placas (BioRad, Tóquio, Japão) a 450 nm e comparada a uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas dos mediadores recombinantes.

### 3.8 PROTOCOLO DO ESTUDO

A randomização para participação no estudo em um dos 4 grupos foi realizada de forma aleatorizada por meio do programa WinPepi (PEPI-for-Windows), sendo que o grupo controle não realizou nenhum tipo de intervenção terapêutica, apenas no instante em que participou do protocolo do estudo, no entanto, nos demais momentos foi atendido pela fisioterapia no período em que esteve na UTI. O grupo da CEP para membros inferiores realizou a cicloergometria através do cicloergômetro (Flex Motor com sensor; Cajumoro; Bragança Paulista; São Paulo, Brasil) de membros inferiores com 30 rotações programadas por minuto durante 20 minutos. A Figura 8 demonstra o protocolo de cicloergometria passiva de membros inferiores.



**Figura 8:** Ilustração da aplicação da cicloergometria de membros inferiores em pacientes críticos sob VM.

**Fonte:** Arquivo de imagens do autor.

**Definição das abreviações:** VM = ventilação mecânica

Os pacientes randomizados para o grupo EENM de membros inferiores utilizaram a estimulação elétrica funcional (Figura 9) no ventre muscular do quadríceps, músculo reto femoral e vasto lateral. Os eletrodos foram colocados neste músculo e o estimulador elétrico transcutâneo foi o (Neurodyn- 4canaís, Ibramed, São Paulo, Brasil), que foi programado para o fortalecimento muscular com uma largura de pulso de  $500\mu\text{sec}$ , frequência de 50Hz, 2 segundos de elevação, 5 segundos de sustentação e 2 segundos descida, com um tempo ON/OFF de 1:1. A intensidade de corrente foi estabelecida através da contração muscular visível e caso essa visualização não fosse possível, era realizada a palpação do músculo estimulado. A duração da sessão foi de 20 minutos para cada músculo quadríceps estimulado, sendo realizado a EENM nos dois quadríceps de ambos os membros inferiores ao mesmo tempo (FRANÇA et al., 2013).



**Figura 9:** Ilustração da aplicação da estimulação elétrica muscular no quadríceps em pacientes críticos sob VM. (quadríceps – reto femoral e vasto lateral).

**Fonte:** Arquivo de imagens do autor.

**Definição das abreviações:** VM = ventilação mecânica

Por fim, no último grupo, os pacientes foram submetidos às duas intervenções, CEP e EENM, sendo a escolha por qual terapêutica ser iniciada, determinada de forma aleatória por meio do programa WinPepi (PEPI-for-Windows).

### 3.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos do HAM, de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos com o CAAE: 04563612.5.0000.5197, **Apêndice C**. Durante a abordagem ao responsável legal do paciente os pesquisadores explicaram os objetivos da pesquisa, bem como, a confidencialidade dos dados e foi seguida resolução citada de acordo com Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos do HAM.

## 4 RESULTADOS

Participaram da fase inicial da pesquisa 485 pacientes portadores de patologias de etiologias diversas, dos quais 439 entraram nos critérios de exclusão do estudo e apenas 46 pacientes foram randomizados nos quatro grupos estudados, porém destes, apenas 35 pacientes finalizaram suas análises, sendo distribuídos da seguinte forma: grupo controle (n = 10), grupo EENM (n = 9), grupo EENM e CEP (n = 7) e grupo CEP (n = 9) (Figura 7).

A caracterização da amostra entre os quatro grupos após sua randomização estão apresentadas na tabela 2. Esta demonstra a média e o desvio padrão das variáveis demográficas e clínicas laboratoriais de cada um dos quatro grupos estudados: controle, EENM, EENM e CEP e CEP. Na comparação entre os grupos estudados, não foram observadas diferença entre os valores de idade, altura, peso, IMC, APACHE II, balanço hídrico (BH) nas últimas 24h, escala de sedação de RASS, tempo (T) de VM e de internamento na UTI que os pacientes já tinham antes de iniciar o protocolo do estudo, valores do hemoglicoteste (HGT), complacência estática do sistema respiratório (Cst sr), resistência do sistema respiratório (Rsr), FC, SpO<sub>2</sub>, PAS, pressão arterial diastólica (PAD) e temperatura, o que demonstra que os quatro grupos estudados foram homogêneos entre eles. Nesta mesma tabela também foram descritas as razões principais para admissão do paciente na UTI, assim como, suas comorbidades.

A tabela 3 demonstra a média e o desvio padrão das variáveis analisadas dos parâmetros do hemograma antes e depois uma hora do protocolo de estudo para cada um dos quatro grupos estudados. As variáveis analisadas para o hemograma foram; leucócitos totais, hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas. Para todos os parâmetros avaliados não foram observadas alterações significativas comparando o antes com o depois em todos os grupos avaliados.

**Tabela 2:** Variáveis demográficas e clínicas, motivos da admissão e comorbidades nos quatro grupos estudados.

Váriaveis	Grupos				Valor p*
	Controle (n=10)	EENM (n=9)	EENM + CEP (n=7)	CEP (n=9)	
Idade (anos)	56,80±12,80	64,11±18,19	64,19±10,54	60,11±27,15	0,800
Altura (cm)	164,70±8,82	161,78±6,26	166,71±6,42	158,56±6,32	0,126
Peso (Kg)	71,10±13,37	66,67±9,35	68,57±14,53	68,89±11,79	0,889
IMC (Kg/cm <sup>2</sup> )	25,92±4,02	26,19±3,29	29,88±13,5	27,35±5,48	0,341
APACHE II	22,60±4,22	20,78±5,58	21,71±3,86	22,67±8,36	0,888
BH -24h (ml)	972,20±703,84	993,78±551,04	1504,14±944,82	838,33±693,26	0,311
RASS	-4,50±0,707	-4,44±0,726	-4,29± 0,951	-4,89±0,333	0,098
T VM (dias)	4,9±2,80	5,67±3,35	4,29±1,38	6,44±3,64	0,174
T UTI (dias)	4,70±2,45	7,22±5,91	4,57±1,27	7,78±3,96	0,108
HGT	156,80±66,97	158,11±56,35	155,43±43,81	125,33±47,69	0,267
Cst (ml/cmH <sub>2</sub> O)	32,88±10,48	30,55±11,06	30,84±9,48	25,17±7,90	0,392
Rsr (cmH <sub>2</sub> O/L/s)	13,65±5,11	12,33±1,73	13,14±5,27	15,00±6,74	0,727
FC (bpm)	81,70±18,80	88,33±19,71	89,14±17,02	85,56±12,75	0,799
SpO <sub>2</sub> (%)	97,90±1,96	97,44±2,92	97,00±2,44	97,44±2,18	0,897
PAS (mmHg)	135,80±2727,21	124,44±22,73	134,29±27,43	136,11±20,44	0,712
PAD (mmHg)	77,90±16,01	69,33±9,31	83,86±13,85	76,56±16,06	0,253
Temperatura (°C)	36,30±0,67	36,94±0,71	36,64±0,43	36,67±0,38	0,140
Motivo da admissão					
Desordem respiratória	4 (40,0)	5 (55,5)	3 (42,8)	4 (44,4)	–
Desordem cardíaco	2 (20,0)	2 (22,2)	2 (28,5)	2 (22,2)	–
Infecção	2 (20,0)	1 (11,1)	1 (14,2)	2 (22,2)	–
Outros	2 (20,0)	1 (11,1)	1 (14,2)	1 (11,1)	–
Condição de comorbidade					
Respiratória	2 (20,0)	2 (22,2)	1 (14,2)	1 (11,1)	–
Cardíaca	3 (30,0)	1 (11,1)	2 (28,5)	3 (33,3)	–
Endócrina	1 (10,0)	1 (11,1)	1 (14,2)	1 (11,1)	–
Urinária	1 (10,0)	2 (22,2)	3 (42,8)	1 (11,1)	–
Falência renal crônica	2 (20,0)	2 (22,2)	1 (14,2)	2 (22,2)	–
Infecção	1 (10,0)	3 (33,3)	1 (14,2)	1 (11,1)	–

Os dados foram expressos como números absolutos (%) e média ± desvio padrão.

\* Teste de one-way ANOVA.

Definição das abreviações: IMC = índice de massa corpórea; APACHE II = *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*; BH -24h = balanço hídrico nas últimas 24 horas; RASS = *Richmond Agitation-Sedation Scale*; T VM = tempo de ventilação mecânica antes de iniciar o protocolo do estudo; T UTI = tempo na unidade de terapia intensiva antes de iniciar o protocolo do estudo; HGT = valores do hemoglicoteste; Cst sr= complacência estática do sistema respiratório; Rsr = resistência do sistema respiratório; FC = frequência cardíaca; SpO<sub>2</sub> =

saturação periférica de oxigênio; PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; EENM = estimulação elétrica neuromuscular e CEP = cicloergometria passiva.

**Tabela 3:** Hemograma com plaquetas avaliado antes e depois de uma hora do protocolo do estudo para os quatro grupos estudados.

Hemograma	Grupos							
	Controle (n=10)		EENM (n=9)		EENM + CEP (n=7)		CEP (n=9)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<b>Leucócitos</b> ( $10^3/\mu\text{L}$ )	13,17±9,36	13,08±7,893	12,62 ± 5,92	12,57±5,62	13,31±3,46	12,10±3,01	13,87±4,27	14,61±4,76
	*p=0,314		*p=0,953		*p=0,456		*p=0,326	
<b>Hemácias</b> ( $10^6/\mu\text{L}$ )	3,23±0,83	3,17±0,85	3,16±0,63	3,17±0,45	3,87±0,86	3,75±0,87	3,10±0,61	3,12±0,64
	*p=0,221		*p=0,514		*p=0,620		*p=0,674	
<b>Hemoglobina</b> (g/dL)	9,20±2,17	9,06±2,25	9,34±1,81	9,39±1,40	10,71±2,71	10,39±2,77	8,83±1,48	9,00±1,62
	*p= 0,341		*p=0,674		*p=0,4557		*p=0,125	
<b>Hematócrito</b> (%)	28,4±7,23	27,98±7,53	28,7±5,79	28,8±4,26	34,1±8,99	32,97±8,99	27,6±4,78	27,9±5,11
	*p=0,314		*p=0,514		*p=0,455		*p=0,173	
<b>Plaquetas</b> ( $10^3/\mu\text{L}$ )	255,7±194	255,30±182	253,56±134	229,0±124	201,8±98,8	202,8±88,9	256,4±138	265,8±137
	*p= 0,721		*p=0,260		*p=0,528		*p=0,086	
<b>Neutrófilos</b> (%)	76,90±7,2	77,80±6,7	77,30±11,9	79,18±13,0	88,30±5,6	87,5±4,3	84,66±7,1	84,66±7,1
	*p=0,407		*p=0,093		*p=0,398		*p=0,343	
<b>Linfócitos</b> (%)	13,19±5,25	12,11±4,33	9,41±4,51	7,61±4,52	6,85±4,16	6,81±3,29	7,62±3,97	7,88±5,27
	*p=0,333		*p=0,097		*p=0,462		*p=0,612	
<b>Monócitos</b> (%)	5,94±3,97	5,49±3,57	4,39±3,36	4,15±3,13	3,61±2,65	3,81±2,21	4,93±1,90	5,04±2,52
	*p=0,635		*p=0,236		*p=0,446		*p=0,678	

Os dados foram expressos em média ± desvio padrão.

\* Comparação antes e depois para cada grupo - Teste de Wilcoxon;

Definição das abreviações: EENM = estimulação elétrica neuromuscular e CEP = cicloergometria passiva.

A Tabela 4 demonstra a média e o desvio padrão dos valores do ON cultivado nos monócitos estimulados (controle positivo (C+)) e não estimulados (controle negativo (C-)) sendo avaliados antes e depois do protocolo do estudo para os quatro grupos investigados. Foi observada redução significativa na produção de ON nas células estimuladas e não estimuladas, comparando o antes com o depois no grupo submetido à EENM e no grupo

submetido a CEP. Já para os grupos controle e EENM e CEP, não foram encontradas nenhuma alteração significativa, demonstrando que isoladamente, tanto a EENM como a CEP mostraram-se eficazes na redução do estresse oxidativo celular, porém quando estas técnicas foram utilizadas em associado não demonstram efeitos benéficos na redução do estresse oxidativo celular.

**Tabela 4:** Produção do ON cultivado no monóxido, no C+ e C- avaliados nos instantes antes e depois dos quatro grupos.

Grupos								
Óxido nítrico	Controle (n=10)		EENM (n=9)		EENM + CEP (n=7)		CEP (n=9)	
	<u>Antes</u>	<u>Depois</u>	<u>Antes</u>	<u>Depois</u>	<u>Antes</u>	<u>Depois</u>	<u>Antes</u>	<u>Depois</u>
<b>ON (C+)</b> ( $\mu\text{M}$ )	10,78 $\pm$ 10,6	11,51 $\pm$ 12,4	8,19 $\pm$ 6,4	6,96 $\pm$ 5,4	12,95 $\pm$ 6,1	13,60 $\pm$ 7,1	20,82 $\pm$ 16,2	17,72 $\pm$ 16,7
	p = 0,3123		<b>p = 0,0188</b>		p = 0,2644		<b>p = 0,0002</b>	
<b>ON (C-)</b> ( $\mu\text{M}$ )	10,30 $\pm$ 9,9	11,84 $\pm$ 13,2	8,64 $\pm$ 6,7	7,49 $\pm$ 5,6	14,12 $\pm$ 8,5	15,25 $\pm$ 9,2	29,90 $\pm$ 23,7	18,72 $\pm$ 19,6
	p = 0,2852		<b>p = 0,0258</b>		p = 0,6743		<b>p = 0,0007</b>	

Valor  
p\*

Valor  
p\*

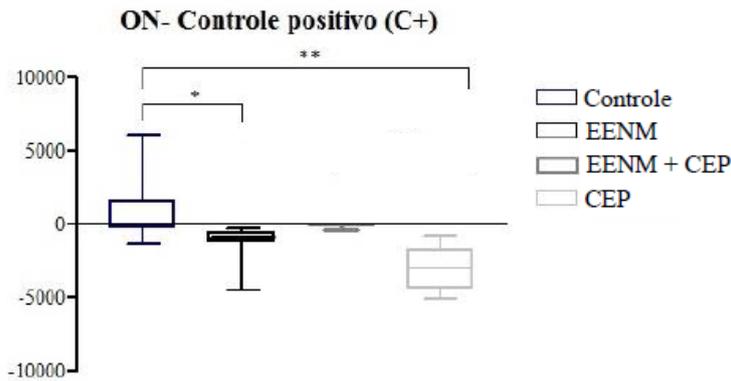
Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

\* Comparação antes e depois para cada grupo - Teste de Wilcoxon;

Negrito = diferença estatística.

Definição das abreviações: ON = óxido nítrico; C+ = controle positivo; C- = controle negativo; EENM = estimulação elétrica neuromuscular e CEP = ciloergometria passiva.

A Figura 10 representa os resultados obtidos, a partir da análise das diferenças na produção de ON, sendo considerada a diferença da coleta depois com a realizada antes do protocolo de estudo, em monócitos estimulados (controles positivos (C+)) nos quatro grupos estudados. Nesta figura, percebesse uma redução significativa na diferença da produção do ON comparando o grupo EENM ( $p < 0,05$ ) e o grupo CEP ( $p < 0,001$ ) com o grupo controle.



**Figura 10:** Diferença da produção do ON nos monócitos C+ dos quatro grupos estudados.

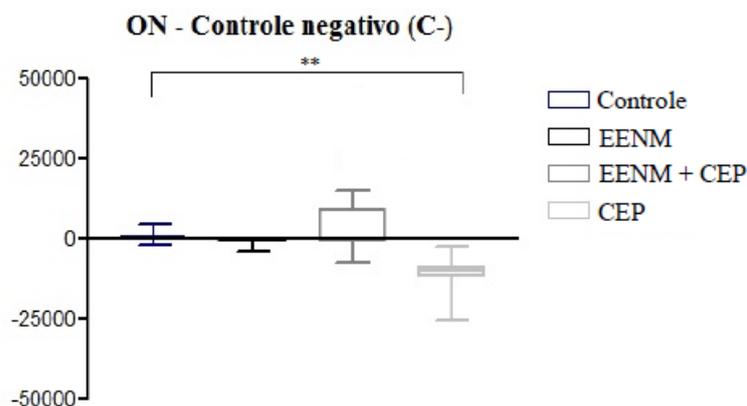
Teste de teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn.

\*Diferença entre o grupo EENM e controle ( $p < 0,05$ );

\*\* Diferença entre grupo CEP e controle ( $p < 0,001$ );

Definição das abreviações: ON = óxido nítrico; C+ = controle positivo; EENM = estimulação elétrica neuromuscular e CEP = cicloergometria passiva.

A Figura 11 representa os resultados obtidos, a partir da diferença da produção de ON, sendo considerada a diferença da coleta depois com a realizada antes do protocolo de estudo, em monócitos não estimulados (controles negativos (C-)) nos quatro grupos estudados. Nesta figura percebe-se uma redução significativa na diferença da produção do ON apenas no grupo que realizou a CEP comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).



**Figura 11:** Diferença da produção ON nos monócitos C- dos quatro grupos estudados.

Teste de teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn.

\*\*Diferenças entre o grupo exercício e controle ( $p < 0,001$ ).

Definição das abreviações: ON = óxido nítrico; C- = controle negativo; EENM = estimulação elétrica neuromuscular e CEP = cicloergometria passiva.

A Tabela 5 mostra as médias e o desvio padrão dos valores das citocinas: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10, avaliadas nos instantes antes e depois, dos quatro grupos estudados. Para todos os grupos avaliados comparando o antes com o depois, apenas o grupo submetido a CEP foi observada redução significativa da concentração de TNF- $\alpha$  após o protocolo do estudo, comparado com antes de iniciar o protocolo. Já para os demais grupos, não foram observadas diferenças significativas nas demais citocinas estudadas.

**Tabela 5:** Valores das citocinas; TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10, avaliados nos instantes antes e depois dos quatro grupos estudados.

Citocina	Grupos								Valor p*
	Controle (n=10)		EENM (n=9)		EENM + CEP (n=7)		CEP (n=9)		
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/mL)	3,11 $\pm$ 0,464	3,10 $\pm$ 0,612	2,96 $\pm$ 0,207	3,23 $\pm$ 0,372	3,21 $\pm$ 0,484	2,97 $\pm$ 0,347	4,33 $\pm$ 1,22	3,27 $\pm$ 1,09	
	p=0,4359		p=0,1949		p=0,3401		p = <b>0,0490*</b>		Valor p*
<b>IFN-<math>\gamma</math></b> (pg/mL)	1,91 $\pm$ 0,086	1,88 $\pm$ 0,030	1,92 $\pm$ 0,075	1,90 $\pm$ 0,044	1,89 $\pm$ 0,045	1,95 $\pm$ 0,125	1,94 $\pm$ 0,137	1,94 $\pm$ 0,105	
	p = 0,7394		p = 0,7984		p = 0,3829		p = 0,5457		Valor p*
<b>IL-6</b> (pg/mL)	3,02 $\pm$ 0,738	2,97 $\pm$ 0,749	2,76 $\pm$ 0,537	2,69 $\pm$ 0,522	2,86 $\pm$ 0,929	2,86 $\pm$ 0,846	2,52 $\pm$ 0,344	2,75 $\pm$ 0,473	
	p=0,9705		p=0,7984		p=1,000		p=0,7962		Valor p*
<b>IL- 10</b> (pg/mL)	1,96 $\pm$ 0,305	1,87 $\pm$ 0,066	1,91 $\pm$ 0,032	1,91 $\pm$ 0,038	2,03 $\pm$ 0,275	1,89 $\pm$ 0,061	1,90 $\pm$ 0,035	2,28 $\pm$ 0,195	
	P=0,7394		p=0,7984		p=0,1282		p=0,2581		Valor p*

Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

\* Comparação antes e depois para cada grupo - Teste de Wilcoxon;

Definição das abreviações: TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa; IFN- $\gamma$  = interferon gama; IL-6 = interleucina 6; IL-10 = interleucina 10; EENM = estimulação elétrica neuromuscular e CEP = cicloergometria passiva.

## 5 DISCUSSÃO

São poucos os estudos na literatura que descrevem os efeitos da EENM e da CEP sobre o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias aplicado ao paciente crítico, no entanto, vários outros benefícios destas intervenções já foram amplamente comprovados, principalmente no que se refere à atenuação da perda de massa muscular e melhora da funcionalidade (WINKELMAN, 2007).

No período em que os pacientes permanecem restritos ao leito, ocorre transformação das fibras musculares para o tipo II, incluindo a redução da capacidade oxidativa, da densidade mitocondrial e de capilares sanguíneos. Além disso da redução no desempenho cardiovascular com menor volume de ejeção sistólico e aumento da frequência cardíaca. Há estase venosa, devido à redução da atividade de contração muscular nos membros e aumento do risco do desenvolvimento de trombose venosa profunda. O período de restrição ao leito também pode contribuir para a desmineralização óssea e a redução do sódio e água corporal (NAVA et al., 2002).

No presente estudo, os valores descritos na tabela 2, demonstram que não foram observadas diferenças nas características demográficas e clínicas laboratoriais dos pacientes nos quatro grupos estudados, o que caracteriza a homogeneidade entre os grupos do estudo para todos os parâmetros avaliados. Os nossos resultados de homogeneidade entre os grupos são importantes, pois não expõe nenhum dos quatro grupos estudados a um maior fator de risco para comprometimento de sua condição clínico laboratorial que pudessem interferir nos nossos resultados. De Jhonge et al. (2002) e Latronico (2010), demonstraram que a disfunção muscular do doente crítico é uma condição clínica bastante evidenciada nesses pacientes críticos e que a magnitude dessa disfunção é extremamente variável e apresenta íntima associação com o tempo de permanência no leito e a exposição aos fatores de risco, como a condição nutricional e a dependência da VM.

Na tabela 3, avaliamos o comportamento da contagem das células do hemograma nos quatro grupos estudados. Para todas as contagens das células avaliadas, não foi evidenciado nenhum tipo de alteração, comparando antes e depois de uma hora do procedimento em todos os grupos estudados, o que pode demonstrar que as intervenções aplicadas, tanto quanto, sua intensidade e duração, não foram suficientes para produzirem alterações nas células do sangue, após a sua aplicação. Esses achados podem ser explicados pelo baixo estresse ao

sistema cardiovascular observados na aplicação dessas duas técnicas ao paciente crítico, consequentemente, não sendo suficientes para promover alterações nas sérias branca e vermelha do sangue.

Os nossos resultados corroboram com os achados de Oliveira et al. (2002) que ao estudarem os efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre os leucócitos de ratos diabéticos, estudando quatro grupos, sendo eles: controle sedentário, controle treinado, diabético sedentário e diabético treinado, não observaram diferenças na contagem diferencial dos linfócitos, neutrófilos e eosinófilos e contagem total de leucócitos entre os grupos estudados (OLIVEIRA et al., 2002).

Já Passaglia et al. (2012), ao estudarem os efeitos agudos do exercício físico prolongado: avaliação após ultramaratona de 24 horas, em vinte corredores avaliados um dia antes e imediatamente após a prova, não observaram mudança no hematócrito ou níveis de hemoglobina. No entanto, os mesmos autores observaram uma leucocitose, com acentuada formação de neutrófilos e uma linfocitose associada. Foram encontradas ainda, alterações cardiológicas que sugerem que o fenômeno de fadiga cardíaca pode ocorrer nessa modalidade de corrida (PASSAGLIA et al., 2012).

Stiller et al. (2007), definiram uma série de critérios de segurança para mobilizar o paciente crítico, estando dentro desses critérios uma boa reserva cardiovascular, reserva respiratória e critérios clínico laboratoriais favoráveis, entre eles, número de leucócitos, hemoglobina e contagem de plaquetas. Nos dias atuais, a EENM vem sendo considerada parte integrante do programa de mobilização precoce, principalmente utilizada nos estágios iniciais da mobilização. Nossos achados adicionam-se aos critérios de segurança estabelecidos por Stiller et al., (2007) que demonstram que tanto a EENM como a CEP iniciadas com critérios mínimos de segurança, não oferecem risco, pois não foram suficientes para promover mudanças nos parâmetros hematológicos em pacientes críticos (STILLER et al., 2007).

Algumas evidências sugerem que a inatividade pode contribuir para uma resposta inflamatória. As citocinas próinflamatórias e o estresse oxidativo têm sido investigados como potenciais causas para a fraqueza muscular associado à doença crítica aguda. Em resposta a essa importante implicação clínica o processo de reabilitação é uma das formas de prevenção mais estudadas na literatura atual. O papel do estresse oxidativo e de citocinas inflamatórias selecionadas sobre a musculatura tem sido estudada em laboratório nos modelos animais. Acredita-se que a atividade física possa mudar a mensagem celular inflamatória em pessoas saudáveis. (WINKELMAN, 2007)

O exercício físico, quando praticado de forma regular, comporta-se como um agente terapêutico e/ou de prevenção para numerosas situações de comorbidade, com a consequente diminuição da mortalidade. No entanto, em oposição aos seus potenciais efeitos benéficos, o exercício físico agudo pode, sobretudo se exaustivo, também induzir alterações orgânicas nefastas, especialmente quando os diferentes tecidos, órgãos ou sistemas não se encontram suficientemente adaptados para suportar os diferentes tipos de sobrecarga que lhes são exigidas. (LEES & BOOTH, 2005)

O aumento do estresse mecânico imposto, por exemplo, às fibras musculares esqueléticas solicitadas e às células dos sistemas osteoarticular e cardiovascular e as elevações da temperatura corporal e da taxa metabólica, ocorrem durante o exercício agudo. Além destas solicitações orgânicas, há cada vez mais evidências de que, durante o exercício físico agudo, tal como em qualquer outra situação que envolva um aumento súbito do metabolismo celular, ocorre também uma concomitante sobrecarga orgânica oxidativa, com a consequente lesão oxidativa, cuja magnitude parece ser dependente da intensidade, da duração e do tipo de exercício realizado. (LEES & BOOTH, 2005)

Estando o estresse oxidativo fortemente associado à fisiopatologia de numerosas doenças de carácter crônico/degenerativo, assim como às alterações degenerativas teciduais que caracterizam o envelhecimento orgânico, poderá ser difícil, numa primeira análise, conciliar o incremento do estresse oxidativo induzido pelo exercício agudo com os seus potenciais efeitos benéficos para a saúde de quem o pratica. (HARMAN, 2003) Contudo, a prática regular de exercício físico pode, quando eficazmente adaptado para cada indivíduo, aumentar a capacidade de defesa orgânica contra a ocorrência dessas lesões oxidativas em diferentes órgãos e tecidos corporais, dando uma maior proteção celular e tecidual aos indivíduos treinados, a qual se faz sentir quer em situações de repouso, quer durante a prática do exercício agudo. (JI, 2002)

Essas lesões oxidativas ocorrem por moléculas altamente reativas e potencialmente tóxicas para o organismo, as quais, por conterem um ou mais elétrons desemparelhados numa das suas órbitas externas são denominados radicais livres. Esta particularidade lhes confere a reatividade e a instabilidade química que os caracterizam, tendendo a interagir com outras moléculas na sua proximidade, através da captação (comportando-se como oxidantes) ou da cedência (atuando como redutores) de elétrons e/ou de átomos de hidrogênio. Deste modo, particularmente quando presentes em elevadas concentrações, eles podem induzir alterações severas na estrutura de moléculas fundamentais para a manutenção da homeostasia celular, resultando numa possível perda de funcionalidade ou até mesmo na perda da viabilidade da

célula. (YU, 1994)

Contudo, além desta potencial ação sobre a integridade e a funcionalidade das diferentes moléculas, os radicais livres, têm também sido responsabilizados pela regulação de importantes mecanismos fisiológicos, tais como a sinalização celular, a regulação da expressão de alguns genes, a mediação da reação inflamatória e a potencialização dos mecanismos de defesa orgânica, uma vez que fazem parte integrante do arsenal de armas letais leucocitárias. (JI, 2006)

No músculo esquelético, estas substâncias têm sido largamente estudadas. Assim, já se sabe que a taxa de produção de radicais livres no músculo esquelético encontra-se elevada em algumas situações de doença ou patologia e que, em indivíduos saudáveis, em situações fisiológicas, pode ser incrementada, comparativamente às situações de repouso, em função da intensidade, duração e tipo de exercício físico efetuado. (SEN, 1995)

Os radicais livres passaram a ser designados de ERO ou ERN que também desempenham importantes funções na sinalização celular, quer em situações fisiológicas, quer patológicas. Uma das principais ERN é o ON, sintetizado pela oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina, sendo esta reação catalisada pela enzima ON-sintase. Enquanto algumas dessas espécies são altamente lesivas ao organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outras são reativas apenas com os lipídios. Existem ainda algumas que são pouco reativas, mas, apesar disso, podem gerar espécies danosas. (BARREIROS, 2006)

Na Tabela 4 observamos uma redução na produção de ON nas células estimuladas e não estimuladas, comparando o antes com o depois no grupo submetido à EENM e no grupo submetido a CEP, demonstrando que isoladamente, tanto a EENM quanto a CEP, mostraram-se eficazes. Não apenas a EENM, como também, a CEP aplicado ao paciente crítico no presente estudo demonstrou ter efeitos benéficos em reduzir o estresse oxidativo celular quando comparado ao grupo controle. Estes achados sugerem que estas intervenções quando aplicada de forma isolada ao doente crítico sejam suficientes para alterar positivamente o *status* redox de células e tecidos por diminuir os níveis basais de ERN, após uma hora de sua aplicação, sendo considerado benéfico à saúde. De fato o exercício físico regular resulta em adaptações na capacidade antioxidante, as quais protegem as células contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo, prevenindo danos celulares subsequentes (AGUILO et al., 2003; DEKKERS et al., 1996).

Gerovasili et al. (2009), verificaram que a EENM aplicada precocemente em pacientes críticos, foi capaz de induzir efeitos agudos sobre a microcirculação sistêmica. Esses efeitos foram demonstrados através do aumento da perfusão sanguínea na musculatura tenar verificada através de um dispositivo de espectroscopia infravermelha proximal, logo após a aplicação de 45 minutos da EENM. O efeito sistêmico da EENM neste estudo foi comprovado pela capacidade de melhorar a perfusão tecidual em grupos musculares distantes aos eletroestimulados, atribuída à técnica um potencial para prevenir a polineuropatia do doente crítico. Esta hipótese foi fundamentada pela existência de estudos que demonstram um possível efeito da EENM em liberar mediadores antiinflamatórios no local estimulado, que posteriormente podem ser distribuídos na corrente sanguínea, promovendo aumento da perfusão em grupos musculares à distância (GEROVASILI et al., 2009)

As figuras 10 e 11 demonstraram redução na diferença da produção de ON, tanto nas células estimuladas quanto não estimuladas, comparando os instantes antes e depois do protocolo do estudo no grupo que fez apenas CEP comparado com o grupo controle. Na figura 10, observamos também uma redução na diferença da produção do ON, apenas na célula estimulada, no grupo submetido à EENM comparado ao grupo controle. Algumas explicações prováveis para redução da resposta ao estresse oxidativo encontrada nesses dois grupos pode ser atribuída a um metabolismo oxidativo melhorado dos pacientes destes dois grupos antes mesmo de sua inserção na pesquisa, ao nível de duração e intensidade da atividade o qual os mesmos foram submetidos e a uma regulação positiva das defesas antioxidantes.

Estes achados estão de acordo com o estudo de David et al. (2009) que estudaram os efeitos da EENM associada a uma dieta manipulada sobre o estresse oxidativo em pacientes com esclerose múltipla progressiva, observaram redução do estresse oxidativo e excitotoxicidade associado com grandes ganhos funcionais desses pacientes (DAVID et al., 2009).

Semelhante, (BUSTAMANTE et al., 2008), ao estudarem os efeitos da estimulação magnética no quadríceps de pacientes com DPOC grave durante um período de 8 semanas sobre o estresse oxidativo, observaram que esta terapêutica foi bem tolerada e não promoveu aumento do estresse oxidativo do músculo.

Esses mesmos achados foram encontrados por Mercken et al. (2005) que ao estudarem os efeitos do exercício realizado em uma bicicleta ergométrica sobre o estresse oxidativo avaliado antes do exercício e após 4 horas a sua utilização em pacientes com DPOC submetidos a um programa de reabilitação pulmonar por 8 semanas comparado com indivíduos saudáveis, observaram uma diminuição das ERO com consequente redução nos

danos no DNA. A reabilitação pulmonar aumentou a capacidade desses pacientes de realizarem exercício e foi associado com a redução do estresse oxidativo induzido pelo exercício.

Assim como o estresse oxidativo, algumas citocinas selecionadas também influenciam na disfunção e degradação muscular em pacientes críticos. Em um modelo para explicar a caquexia, Reid (2001), sugeriu que a interação entre a ERO e citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  são sinérgicos, talvez indicativo de um ciclo de *feedback* positivo patológico, que faz baixar a regulação da reparação do tecido muscular danificado. Assim, não é simplesmente a supressão direta da atividade muscular que leva à disfunção na presença de TNF- $\alpha$ , mas um decréscimo de reparação e/ou incremento da apoptose que resultam no enfraquecimento muscular mediados por estas citocinas inflamatórias (REID, 2001).

Na tabela 5, podemos observar que das citocinas avaliadas, observamos apenas uma única alteração que foi a redução na concentração do TNF- $\alpha$  para o grupo submetido a CEP, comparando os instantes antes e depois de uma hora da realização do exercício nos quatro grupos estudados, sendo suficiente para promover alterações nos parâmetros da resposta imune. Com relação às demais citocinas avaliadas; IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-10, não foram observadas nenhuma alteração comparando antes com o depois do protocolo do estudo para todos os grupos. O nível de intensidade e a duração do exercício, assim como, a cinética das citocinas, pode ter sido fundamental para que houvesse ou não, alterações na concentração das citocinas estudadas, sendo que das citocinas avaliadas, o TNF- $\alpha$  é a primeira a ter seu pico de elevação no plasma nas primeiras horas durante o exercício (FRIEDRICH et al., 2015).

Célia Castro et al. (2002), ao estudarem o exercício físico e o sistema imunológico descreveram que diferentes tipos e cargas de exercício físico podem provocar alterações distintas no sistema imunológico. Neste sentido, é importante conhecer que dependendo do tipo de exercício: agudo, moderado ou intenso podem influenciar alguns parâmetros da imunidade tanto celular como humoral. A variabilidade do tempo de avaliação da função destas células depois do exercício físico, o nível de aptidão física individual e os diferentes protocolos experimentais utilizados podem justificar os diversos resultados encontrados (CÉLIA CASTRO et al., 2002).

Uma das citocinas mais importantes neste processo inflamatório é a IL-6 que tem uma ampla gama de atividade biológica. Ela é sintetizada pela célula do sistema imunológico e pelas células do músculo esquelético, adipócitos, células endoteliais e células do epitélio intestinal (FINK, et al., 2006). Semelhante ao TNF- $\alpha$ , a IL-6 é liberada no início da cascata inflamatória. Ao contrário do TNF- $\alpha$ , a IL-6 aumenta na miosina e parece ter um papel na

manutenção do fornecimento de energia durante o exercício no miócito. A contração muscular induz a síntese e liberação de IL-6 no plasma em grandes quantidades, independente da produção do TNF- $\alpha$ . Durante o exercício, mesmo de baixa intensidade, a IL-6 também é sintetizada e colocada em circulação pelo peritendão e tecidos adiposos (NEMET et al., 2002).

Além das propriedades proinflamatórias, altos níveis de IL-6 agem para estimular o aparecimento de citocinas antiinflamatórias no plasma, incluindo IL-10 e IL-1R $\alpha$ . A IL-6 derivada do músculo reduz a produção de TNF- $\alpha$ , interrompendo a degradação do músculo por meio de destruição da miosina (WINKELMAN, 2007). Muito embora não tenha havido alteração significativa dos valores das citocinas IL-6 e IL-10 em nenhum dos grupos, o único grupo que apresentou elevação nos seus valores após a realização do protocolo de estudo foi o grupo da CEP, fato que pode ter contribuído para a mudança da concentração de TNF- $\alpha$  após 60 minutos mais tarde. Talvez as mudanças nas concentrações de IL-6 e IL-10 ocorram em outro período de duração do nosso estudo, o qual não foi monitorado.

A supressão de citocinas proinflamatórias como a IL-6, especialmente as poderosas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , podem beneficiar pacientes criticamente enfermos. A IL-10 é uma citocina antiinflamatória, inicialmente identificada pela sua capacidade para desligar a produção de citocinas pelas células T. Investigações têm demonstrado que a IL-10 inibe a síntese de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , intermediários reativos de oxigênio, e outros fatores proinflamatórios, suprimindo várias respostas imunes através de ações individuais sobre vários tipos de células. Depois do exercício, altos níveis circulantes de IL-6 são seguidos por aumento da produção de IL-10. Estudos sugerem que o exercício faça com haja uma ação antiinflamatória através da indução de IL-10 e inibição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Os mensageiros celulares, IL-6 e IL-10, estão implicados na manutenção da função muscular durante o alongamento e alguns tipos de exercício. O exercício físico é explorado como um agente regulador da inflamação e da função muscular (WINKELMAN, 2007). A verdade é que importantes implicações clínicas tem sido demonstradas, sendo o exercício físico umas das principais formas de prevenção na função muscular do paciente crítico.

Nossos achados podem colaborar para demonstrar a importância clínica das mudanças nas citocinas inflamatórias em pacientes críticos, sendo este, um dos efeitos precoce da mobilização do paciente crítico. Um estudo mais aprofundado dessas terapêuticas aplicado por mais de uma sessão, pode indicar mudanças no perfil de citocinas em resposta a uma atividade em pacientes criticamente doentes.

Já Amidei et al. (2013), ao estudarem os efeitos do exercício passivo em 30 pacientes críticos com até 72 horas de VM durante 20 minutos sobre os sinais vitais, a presença de dor e as citocinas inflamatórias que foram avaliadas em três momentos, antes, logo após a cicloergometria passiva e 60 minutos depois, concluíram que esta intervenção foi bem tolerada, reduziu a presença de dor e fez com que houvesse redução do níveis de IL-6 após 60 minutos do exercício passivo, demonstrando os benefícios fisiológicos antecipados do exercício. Os autores descreveram ainda que essa redução significativa na concentração de IL-6 desde o início até ao final da intervenção combinada com a falta de mudanças significativas no final período de repouso que se seguiu à intervenção, apóia não apenas a noção de que o exercício passivo não piora a inflamação, mas também que o exercício pode ter sido responsável por uma diminuição da IL-6 (AMIDEI et al., 2013).

Segundo Winkelman et al. (2007), em indivíduos saudáveis, incrementos no TNF- $\alpha$  são variáveis em resposta ao exercício, sendo maior quando o estresse oxidativo está presente durante o exercício. Níveis séricos do TNF- $\alpha$  também reduzem os níveis de antioxidantes em alguns músculos esqueléticos. Como TNF- $\alpha$  é uma citocina proinflamatória, estimula a síntese de vários fatores, incluindo moléculas de adesão, ON e ERO (WINKELMAN et al., 2007).

Apesar de não termos observado alterações em todas as citocinas inflamatórias avaliadas em uma única sessão com a utilização da CEP e da EENM, acreditamos que a aplicação destas terapêuticas tenha efeitos benéficos sobre os parâmetros da resposta imune, assim como, Karavidas et al. (2006) ao estudarem a aplicação da EENM durante seis semanas em membros inferiores de pacientes cardiopatas graves, observaram que a EENM foi capaz de promover um impacto direto na função endotelial e em marcadores periféricos de ativação antiinflamatória com redução dos níveis do fator de TNF- $\alpha$ , interleucina 6 e melhora do fluxo sanguíneo na artéria braquial observada pela ultrassonografia com doppler. Estas citocinas podem agir sistemicamente como estímulo anabólico muscular atenuando os efeitos catabólicos da doença crítica e do imobilismo. A EENM e o exercício podem também ativar uma via bioenergética que melhora a função mitocondrial dos músculos esqueléticos sistemicamente (KARAVIDAS et al., 2006).

Em outro estudo, avaliando os efeitos sobre os parâmetros da resposta imune, após um total de vinte sessões, Akar et al. (2015), estudaram pacientes com DPOC submetidos à VM cujo objetivo foi investigar o impacto da mobilização ativa e da EENM no processo de desmame, alta hospitalar e mediadores inflamatórios. Eles estudaram 30 pacientes divididos em três grupos, sendo 10 pacientes em cada grupo: grupo 1 – submetido à mobilização ativa

de extremidades e EENM, grupo 2 – submetido apenas EENM e grupo 3 – apenas mobilização ativa de extremidades. Foi observada melhora significativa na força muscular periférica, principalmente de extremidades de membros inferiores, nos grupos que realizaram EENM e exercícios e EENM exclusivamente. Em adição, foram observadas também redução das IL-6 e IL-8 no grupo de pacientes submetidos à EENM (AKAR et al., 2015).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Podemos concluir que para população estudada, tanto a CEP como a EENM aplicado a pacientes críticos em VM não foram suficientes para provocar alterações séricas nas citocinas em uma única sessão da aplicação dessas terapêuticas. No entanto, avaliando os efeitos da CEP e da EENM sobre o estresse oxidativo, foi observada redução na concentração de ON, após uma hora da utilização destas terapêuticas. Estes resultados apontam que a utilização dessas terapêuticas quando aplicadas de forma isolada podem favorecer na redução do estresse oxidativo celular.

Em relação ao comportamento das citocinas inflamatórias avaliadas no presente estudo, observamos que a aplicação da CEP foi à única terapêutica capaz de provocar redução na concentração de TNF- $\alpha$ , desta forma, atuando na redução do processo inflamatório, comum em pacientes críticos.

Devemos considerar que novas pesquisas com essas intervenções possam avaliar uma variabilidade maior do tempo de avaliação da função destas células após o exercício físico, o nível de aptidão física individual dos pacientes antes da doença crítica e a duração e intensidade da atividade estabelecida nos diversos protocolos para que possamos tornar os resultados mais conclusivos.

## REFERÊNCIAS

ABRAMSON, J. *WINPEPI (PEPI-for-Windows)*: computer programs for epidemiologist. *Epidemiol Perspect Innovs*.

AGUILO, A. et al. Effect of exercise intensity and training on antioxidants and cholesterol profile in cyclists. *J Nutr Bio-chem*, v.14, n.6, p. 319 – 325, 2003.

AKAR, O. et al. Efficacy of Neuromuscular Electrical Stimulation in Patients with COPD Followed in Intensive Care Unit. *Clin Respir J*, v. 24, p.1 - 8, 2015.

ALI, N. A. et al. Acquired weakness, handgrip strength, and mortality in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 178, n. 3, p. 261- 268, 2008.

ALLEN, D. C. et al. Critical illness myopathy: further evidence from muscle-fiber excitability studies of an acquired channelopathy. *Muscle Nerve*, v. 37, p. 14 - 22, 2008.

AMIDEI, C.; SOLE, M. L. Physiological responses to passive exercise in adults receiving mechanical ventilation. *Am J of Critical Care*, v. 22, p. 337 - 349, 2013.

ANGELOPOULOS, E. et al. Acute microcirculatory effects of medium frequency versus high frequency neuromuscular electrical stimulation in critically ill patients – a pilot study. *Annals of Intensive Care*, v. 3, p. 39, 2013.

BAIN, B. J; GUPTA, R. *A-Z of Haematology*. Blackwell Publishing. Oxford. 2003.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova [online]*, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BAX, L. et al. Does neuromuscular electrical stimulation strengthen the quadriceps femoris? A systematic review of randomised controlled trials. *Sports Med*, v. 35, p. 191 - 212, 2005.

BHAKTI, K. et al. Impact of Early Mobilization on the Glycemic and Weakness Muscular acquired control in ICU patients Critics When Mechanically Ventilated. *Chest*, v. 146, n. 3, p. 583 - 589, 2014.

BIERBRAUER, J. et al. Early type II fiber atrophy in intensive care unit patients with nonexcitable muscle membrane. *Crit Care Med*, v. 40, n. 2, p. 647 - 650, 2012.

BITTNER, E. A. et al. Measurement of muscle strength in the invasive care unit. *Crit Care Med*, v. 37, n. 10, p. 321 - 230, 2009.

BUSTAMANTE, V. et al. Redox balance following magnetic stimulation training in the quadriceps of patients with severe COPD. *Free Radical Research*, v. 42, n. 11, p. 939 – 948, 2008.

CANCELLIERO, M. C. et al. EDET para fortalecimento muscular respiratório. *Fisioter Pesq*, v. 19, n. 4, p. 303 - 308, 2012.

CASTRO, L. N. *Engenharia Imunológica: Desenvolvimento e Aplicação de Ferramentas Computacionais Inspiradas em Sistemas Imunológicos Artificiais*. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas (UNICAMPE), Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Departamento de Engenharia de Computação e Automação Industrial, 2001.

CÉLIA CASTRO, M. M. B. et al. Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, v. 2, n. 5, p. 80–90, 2002.

CHIANG, L. L. et al. Effects of Physical Training on Functional Status in Patients With Prolonged Mechanical Ventilation. *Physical Therapy*, v. 86, n. 9, p. 1271- 1281, 2006.

DAVID, R. et al. Neuromuscular electrical stimulation and dietary interventions to reduce oxidative stress in a secondary progressive multiple sclerosis patient leads to marked gains in function: a case report. *Cases Journal*, v. 2, p.7601, 2009.

DE JONGHE, B. et al. Groupe de Refl exion et d'Etude des Neuromyopathies en Reanimation. Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study. *JAMA*, v. 288, n. 22, p. 2859 - 2867, 2002.

DE JONGHE, B. et al. Respiratory weakness is associated with limb weakness and delayed weaning in critical illness. *Crit Care Med*, v. 35, n. 9, p. 2007 - 2015, 2007.

DEKKERS, J. C. et al. The role of antioxidant vitamins and en- zymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med*, v.21, n.3, p.213- 38. 1996.

DELLINGER, R. P. et al. Campanha de sobrevivência à sepse: Diretrizes internacionais para tratamento de sepse grave e choque séptico: 2012. *Critical Care Medicine*, v. 41, n. 2, p. 580 - 637, 2013.

DIAZ, N. L. et al. Histochemical and ultrastructural study of skeletal muscle in patients with sepsis and multiorgan failure syndrome (MOFS). *Histol Histopathol*, v. 13, p. 121 - 128, 1998.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1B. *Crit Care Med*, v. 33, n. 12, p. S460 - 2, 2005.

DUSCHA, B. D. et al. Deconditioning fails to explain peripheral skeletal muscle alterations in men with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, v. 39, p. 1170, 2002.

FINK, M. P. The prevention and treatment of sepsis: Is interleukin-6 a drug target or a drug?. *Crit Care Med*, v. 34, n. 3, p. 919 - 920, 2006.

FRANÇA, E E T. et al. Effects of electrical muscle stimulation early in the quadriceps and tibialis anterior muscle of critically ill patients. *Physiotherapy Theory and Practice*, p. 1-6, 2013.

FRIEDRICH, O. et al. The Sick and the Weak: Neuropathies/Myopathies in the Critically Ill. *Physiol Rev*, v. 95, n. 3, p. 1025 - 1109, 2015.

GEROVASILI, V. et al. Electrical muscle stimulation preserves the muscle mass of critically ill patients: a randomized study. *Crit Care*, v. 13, n. 5, p. 1 - 8, 2009.

GEROVASILI, V. et al. Short-term systemic effect of electrical muscle stimulation in critically ill patients. *Chest*, v. 136, n. 5, p. 1249 - 1256, 2009.

GRUTHER, W. et al. Muscle wasting in intensive care patients: Ultrasound observation of the M. quadriceps femoris muscle layer. *J Rehabil Med*, v. 40, n. 3, p. 185 - 190, 2008.

HARMAN, D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal*, v. 5, n. 5, p. 557-561, 2003.

JANEWAY, C. A. et al. *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*. 4ª ed. 2000, Artes Médicas Sul, Porto Alegre, RS.

JL, L. L. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci*, v. 959, p. 82-92, 2002.

JL, L. L.; GOMEZ-CABRERA, M. C.; VIANA, J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1067, p. 425-435, 2006.

KARAVIDAS, A. I. et al. Functional electrical stimulation improves endothelial function and reduces peripheral immune responses in patients with chronic heart failure. *Eur. J. Cardiovasc. Prev Rehabil*, v. 13, p. 592 - 597, 2006.

KASPER, C. et al. Skeletal muscle damage and recovery. *AACN Clin Issues*, v. 15, n. 2, p. 237 - 247, 2002.

KRANER, S. D. et al. Upregulation of the CaV 1.1-ryanodine receptor complex in a rat model of critical illness myopathy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 300, n. 6, p. 1384 - 1391, 2011.

KRAYCHETE, D. C. et al. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. *Rev Bras Reumatol*, v. 46, n. 3, p. 199 - 206, 2006.

LATRONICO, N.; RASULO, F. A. Presentation and management of ICU myopathy and neuropathy. *Current Opinion in Critical Care*, v. 16, p. 123-127, 2010.

LEES, S.J.; BOOTH, F.W. Physical inactivity is a disease. *World Rev Nutr Diet*, v. 95, p. 73-79, 2005.

LI, Y-P. et al. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB*, v. 12, p. 871 - 880, 1998.

MADOR, M. J.; BOZKANAT, E. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, v. 2, n. 4, p. 216 - 224, 2001.

MERCKEN, E. M. et al. Rehabilitation Decreases Exercise-induced Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 172, p. 994 - 1001, 2005.

MORRIS, P. E. et al. Early intensive care unit mobility therapy in the treatment of acute respiratory failure. *Crit Care Med*, v. 36, p. 2238 - 2243, 2008.

NAVA, S. et al. Muscle retraining in the ICU patients. *Minerva Anesthesiol*, v. 68, n. 5, p. 341-345, 2002.

NEMET, D. et al. Systemic vs local cytokine and leukocyte responses to unilateral wrist flexion exercises. *J Appl Physiol*, v. 93, n. 2, p. 546 - 554, 2002.

OLIVEIRA, C. A. M. et al. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre os leucócitos de ratos diabéticos. *Rev Bras Med Esporte*, v. 8, n. 6, p. 219 – 224, 2002.

PARRY, S. M. et al. Ultrasonography in the intensive care setting can be used to detect changes in the quality and quantity of muscle and is related to muscle strength and function. *J Crit Care*, v. 30, n. 5, p. 1151, 2015.

PASSAGLIA, D. G. et al. Efeitos agudos do exercício físico prolongado: Avaliação após ultramaratona de 24 horas. *Arq Bras Cardiol. [Online]*, p.0-0, 2012.

PERME, C. S. et al. Early Mobilization of LVAD Recipients Who Require Prolonged Mechanical Ventilation. *Texas Heart Institute Journal*, v. 33, p. 130 -133, 2006.

REID, M. B.; LI Y-P. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res*, v. 2, p. 269–272, 2001.

ROSA, L. F. P. B. C; VAISBERG, M. W. Influências do exercício na resposta imune. *Rev Bras Med Esporte*, v. 8, n. 4, p. 167-172, 2002.

SCHEFOLD, J. C. et al. Intensive care unit-acquired weakness (ICUAW) and muscle wasting in critically ill patients with severe sepsis and septic shock. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, v. 1, n. 2, p. 147-157, 2010.

SCHEICKERT, W. D. et al. Early physical and occupational therapy in mechanically ventilated, critically ill patients: a randomized controlled trial. *Lancet*, v. 373, p. 1874 - 1882, 2009.

SEN, C. K. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol*, v.79, n. 3, p. 675-686, 1995.

SILLEN, M. J. et al. Metabolic and structural changes in lower-limb skeletal muscle following neuromuscular electrical stimulation: a systematic review. *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, p. e69391, 2013.

STEFANOUCI, C. et al. Neuromuscular electrical stimulation acutely mobilizes endothelial progenitor cells in critically ill patients with sepsis. *Ann Intensive Care*, v. 6, n. 21, p. 2 – 9, 2016.

STILLER, K. et al. Safety issues that should be considered when mobilizing critically ill patients. *Crit Care Clin*, v. 23, n. 1, p. 35 – 53, 2007.

STRASSER, E. M. et al. Neuromuscular electrical stimulation reduces skeletal muscle protein degradation and stimulates insulin-like growth factors in an age - and current-dependent manner: a randomized, controlled clinical trial in major abdominal surgical patients. *Ann Surg*, v. 249, p. 738 - 743, 2009.

SUPINSKI, G. S. et al. The JNK MAP kinase pathway contributes to the development of endotoxin-induced diaphragm caspase activation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 297, n. 3, p. 825 - 834, 2009.

TOPP, R. et al. The effect of bed rest and potential of prehabilitation on patients in the intensive care unit. *AACN Clin Issues*, v.13, n. 2, p. 263 - 276, 2002.

WEBER-CARSTENS, S. et al. Critical Illness Myopathy and GLUT4 Significance of Insulin and Muscle Contraction. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 187, n. 4, p. 387 – 96, 2013.

WINKELMAN, C. Inactivity and Inflammation in the Critically Ill Patient. *Crit Care Clin*, v. 23, p. 21–34, 2007.

XU, C. et al. Electrical stimulation promotes regeneration of defective peripheral nerves after delayed repair intervals lasting under one month. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, p. e105045, 2014.

YU B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994.

## **APÊNDICES E ANEXOS**

**APÊNDICE A: FICHA DE AVALIAÇÃO PARA INSERÇÃO NO PROTOCOLO DO  
ESTUDO**

LEITO:

NÚMERO:

**HOSPITAL AGAMENON MAGALHÃES****PROTOCOLO DE ESTUDO DA TESE DE DOUTORADO DE EDUARDO ERIKO TENÓRIO DE FRANÇA**

“EFEITO AGUDO DO EXERCÍCIO FÍSICO PASSIVO ASSOCIADO À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA MUSCULAR SOBRE OS PARÂMETROS DO SISTEMA IMUNE E O ESTRESSE OXIDATIVO DE PACIENTES CRÍTICOS”

Nº DO REGISTRO: \_\_\_\_\_ NOME DO PACIENTE: \_\_\_\_\_  
 DATA: \_\_/\_\_/15\_ ALTURA: \_\_\_\_\_ PESO REAL: \_\_\_\_\_ PESO IDEAL: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_  
 IDADE: \_\_\_\_\_ DATA ADMISSÃO: \_\_/\_\_/15\_  
 GRUPO:  $\Delta$ CONTROLE  $\Delta$  ELETROESTIMULAÇÃO  $\Delta$ EXERCÍCIO PASSIVO  $\Delta$ EXERC. + ELETRO

PARÂMETROS UTILIZADOS DURANTE A AVALIAÇÃO INICIAL	
DIAGNÓSTICO	
APACHEII	
BALANÇO HÍDRICO – 24H	
FAZ HEMODIÁLISE	
SEDATIVO UTILIZADO	MIDAZOLAN: PROPOFOL: FENTANILA:
ESCALA DE SEDAÇÃO	RAMSAY: _____ RASS: _____
TEMPO	RESTRIÇÃO AO LEITE: _____ VM: _____ UTI: _____
ANTIBIÓTICO:	
CORTICÓIDE:	
GLICOSE	HGT: _____
COTA CALÓRICA/DIA	VCT: _____ Kcal/dia VCT: _____ Kcal/Kg/dia
GASOMETRIA ARTERIAL	ANTES: pH= _____ PCO2= _____ PO2= _____ HCO3-= _____ BE= _____ P/F= _____ SaO2= _____ Lac= _____
	DEPOIS: pH= _____ PCO2= _____ PO2= _____ HCO3-= _____ BE= _____ P/F= _____ SaO2= _____ Lac= _____
SINAIS VITAIS	ANTES: FR= _____ FC= _____ SpO2= _____ PA= _____ T: _____
MECÂNICA RESPIRATÓRIA	Cst Antes : _____ Rsr Antes: _____ Cst Depois: _____ Rsr Depois: _____
INTENSIDADE DA ELETROTERRAPIA	MID: _____ MIE: _____
PARÂMETROS VENTILATÓRIOS	PCV= _____ TI= _____ RT= _____ FR= / _____ VT= _____ PEEP= _____ FiO2= _____

<b>PROGRAMA DE ELETROESTIMULAÇÃO PARA MEMBROS INFERIORES</b>	
Tempo:	20 minutos (com 10 minutos para aquecimento e resfriamento*)
Intensidade:	até contração muscular visível
Largura de pulso:	500 $\mu$ s
Frequência:	50 Hz
Tempo On/Off:	10s / 10s
*Aquecimento e Resfriamento: 5' de estimulação com F= 10Hz no início e no final da sessão	

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO – Chung and Mueller 2010

<b>CARDIOVASCULAR</b>	<b>RESPIRATÓRIO</b>	<b>NEUROLÓGICO</b>	<b>CLÍNICO</b>
PAM < 65mmHg	SpO2<90%	Agitação psicomotora	Idade < 18anos
FC < 40 ou >130 bpm	FR <5 ou > 35ipm	Morte encefálica	IMC > 35kg/m2
Hemodinâmica - Administração de novo agente vasopressor.	Assincronia paciente ventilador	Doença neuromuscular	Doença vascular
Status cardíaca - Novo infarto cardíaco - Arritmia - Isquemia cardíaca nova	FiO2>60%	Pacientes que não deambulavam antes do internamento	Terapia contra o câncer nos últimos seis meses
Utilização de marca-passo			Gestantes
		Uso de BNM e corticoesteróides	Algum tipo de limitação articular ou fratura em MMII
			Lesão de pele no local de colocação do eletrodo
			Sepse

CRITÉRIOS DE SIRS E SEPSE – Kayambu et al. 2011 (EXCLUSÃO)

<b>SÍNDROME</b>	<b>CRITÉRIO</b>
SIRS dois ou mais critérios	FC> 90bpm FR >20ipm ou PCO2 <32mmHg WCC <4x10 <sup>9</sup> céls/L ou > 12x10 <sup>9</sup> céls/L ou >10% de imaturas 12,000 T>38°C ou T<36°C
SEPSIS	SIRS + infecção prévia
SEPSE severa	Sepsis + falência de um ou mais órgãos
Choque SÉPTICO	Sepsis severa + falência cardiovascular a despeito de uma adequada ressuscitação de fluida. (PAS < 90mmHg ou > 40mmHg)

### **TABELA DE MONITORIZAÇÃO DURANTE O EXPERIMENTO**

PARÂMETROS	TEMPO	FR	FC	SpO2	PA	Cst	Rsr
<b>ANTES</b>							
<b>DURANTE</b>	<b>01min</b>						
	<b>02min</b>						
	<b>03min</b>						
	<b>04min</b>						
	<b>05min</b>						
	<b>06min</b>						
	<b>07min</b>						
	<b>08min</b>						
	<b>09min</b>						
	<b>10min</b>						
	<b>11min</b>						
	<b>12min</b>						
	<b>13min</b>						
	<b>14min</b>						
	<b>15min</b>						
	<b>16min</b>						
	<b>17min</b>						
	<b>18min</b>						
	<b>19min</b>						
	<b>20min</b>						
<b>DEPOIS</b>	<b>10min</b>						
	<b>30min</b>						
	<b>1hora</b>						

**APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

***Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE***

(De acordo com os critérios da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde)

**TÍTULO:** EFEITO AGUDO DO EXERCÍCIO FÍSICO ASSOCIADO À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA FUNCIONAL SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E O SISTEMA IMUNE DE PACIENTES CRÍTICOS

**INVESTIGADORES:** Eduardo Ériko Tenório de França

**LOCAL DE ESTUDO:** Hospital Agamenon Magalhães (HAM).

**ENDEREÇO:** Estrada do Arraial 2723, Casa Amarela CEP: 52051380 Recife-PE Fone: 3184.1659

Neste termo de consentimento podem constar alguns tópicos que você não entenda. Se tiver alguma dúvida, pergunte ao responsável pela pesquisa ou outra pessoa que acompanhe a mesma para que assim possamos deixá-lo (a) esclarecido (a). Você receberá uma cópia deste termo de consentimento para seu registro.

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS:** Como responsável legal, o (a) Senhor (Sra.) está sendo convidado (a) autorizar a participação do (a) paciente \_\_\_\_\_ na pesquisa, onde será submetido (a) a um programa de exercícios e a estimulação muscular em membros inferiores e avaliado efeitos deste programa sobre os mediadores inflamatórios e a oxidação em pacientes na unidade de terapia intensiva.

**DURAÇÃO DO ESTUDO:** A coleta de dados terá a duração de aproximadamente 36 meses, e sua participação será exclusivamente no momento dos exercícios, da estimulação muscular e da avaliação laboratorial.

**RISCOS E DESCONFORTOS:** A metodologia adotada durante a avaliação e intervenção terapêutica, assim como, a análise laboratorial, são procedimentos realizados de rotina dentro da UTI. Caso haja alguma lesão de pele ou desconforto ao paciente durante a pesquisa, a mesma será interrompida imediatamente. Tais riscos serão minimizados com a utilização da terapêutica adequada obedecendo os limites de segurança estabelecidos na literatura.

**CONFIDENCIALIDADE:** As informações obtidas a partir deste estudo serão tratadas rigorosamente com confidencialidade. Os resultados serão divulgados publicamente, entretanto, sua identidade jamais será revelada.

**PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA / RETIRADA:** A participação do paciente sob sua responsabilidade neste estudo é voluntária, você pode recusar-se a autorizar a participação a qualquer momento da pesquisa.

**DÚVIDAS:** Em caso de haver dúvidas adicionais sobre a sua participação, retire-as com o pesquisador. Não assine este termo se não concordar na participação, ou se suas dúvidas não forem esclarecidas satisfatoriamente.

**CONSENTIMENTO DO ENTREVISTADO:** Li e entendi as informações precedentes, descrevendo este estudo e todas as minhas dúvidas foram respondidas satisfatoriamente. Estou consciente de que o estudo não tem fins lucrativos. Dou livremente minha autorização para participação do estudo até que decida pelo contrário. Assinando este termo de consentimento, concordo em autorizar a participação neste estudo e não abro mão, na condição de responsável legal pelo paciente pesquisado, de nenhum direito legal que ele tenha.

\_\_\_\_\_  
Nome do paciente

-----  
Nome do responsável legal

-----  
Assinatura do responsável legal

-----  
Data

Testemunha

\_\_\_\_\_

Testemunha

\_\_\_\_\_

**APÊNDICE C: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital Agamenon Magalhães - HAM

### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** Efeito do exercício físico e da estimulação elétrica funcional sobre o sistema imune de pacientes críticos

**Área Temática:**

**Pesquisador:** EDUARDO ERIKO TENORIO DE FRANÇA

**Versão:** 1

**Instituição:**

**CAAE:** 04563612.5.0000.5197

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 61991

**Data da Relatoria:** 29/07/2012

**Apresentação do Projeto:**

Projeto de Pesquisa: Efeito agudo do exercício físico associado a estimulação elétrica funcional sobre o estresse oxidativo e o sistema imune de pacientes críticos

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Secundário:

1 Avaliar a evolução dos parâmetros hematológicos e da contagem de plaquetas do sangue periférico antes e após a realização do exercício físico e a FES isolados e durante sua associação em pacientes críticos; 2 Analisar alterações no sistema imune, através da proteína C reativa, dos leucócitos e da quantificação das interleucinas IL-6 e IL10 e do TNF-alfa do sangue periférico antes e após a realização do exercício físico e a FES isolados e durante sua associação em pacientes críticos; 3.2.3 Avaliar o efeito do exercício físico e da FES de forma isolada sobre o estresse oxidativo de pacientes críticos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

As intervenções fisioterapêuticas utilizadas neste projeto, como as técnicas aplicadas na metodologia do estudo para avaliação e intervenção terapêutica, assim como, a análise laboratorial, são procedimentos realizados de rotina dentro da terapia intensiva. Caso haja alguma lesão de pele ou desconforto ao paciente durante a pesquisa, a mesma será interrompida imediatamente. Tais riscos serão minimizados com a utilização da terapêutica adequada obedecendo os limites de segurança estabelecidos na literatura.

Benefícios:

Os resultados encontrados em relação ao comportamento dos biomarcadores inflamatórios e o estresse oxidativo frente ao exercício físico associado ou não a FES em pacientes críticos oferecerá importantes informações sobre o impacto destas terapêuticas sobre o sistema imune, podendo assim, ajudar na descoberta de novos tratamentos/ técnicas/ tecnologia/conhecimentos, capazes de diminuir os problemas existentes em relação ao assunto ou objeto pesquisado

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

DE ACORDO COM AS EXIGÊNCIAS DA PLATAFORMA BRASIL.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

FOLHA DE ROSTO: anexada de acordo com as exigência da Plataforma.  
TCLE: de acordo com os normativos

**Recomendações:**

Nenhuma

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não será necessário.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto avaliado pelo comitê de Ética deste Hospital na reunião do dia 27/07/2012, podendo iniciar sua coleta de dados.

RECIFE, 27 de Julho de 2012

---

Assinado por:  
Francisco Alfredo Bandeira e Farias

### **ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO**

“Effects of electrical muscle stimulation early in the quadriceps and tibialis anterior muscle of critically ill patients” publicado no periódico **Physiotherapy Theory and Practice**, Qualis 2014 (B1 - Medicina 1 e B5 nas Ciências Biológicas 1)

RESEARCH REPORT

## Effects of electrical muscle stimulation early in the quadriceps and tibialis anterior muscle of critically ill patients

Letícia Ferreira Falavigna, PT<sup>1</sup>, Michele Gonçalves Silva, PT<sup>1</sup>, Amanda Lopes de Almeida Freitas, PT<sup>1</sup>, Priscila Figueiredo dos Santos Silva, PT<sup>1</sup>, Marçal Durval Siqueira Paiva Júnior, MD, MSc<sup>2</sup>, Célia Maria Machado Barbosa de Castro, MD, PhD<sup>3</sup>, Maria do Amparo Andrade, PT, PhD<sup>3</sup>, Marcos Antonio Cavalcanti Gallindo, MD<sup>2</sup>, Luana Carneiro Ribeiro, PT<sup>3</sup>, Francimar Ferrari Ramos, PT, MSc<sup>2,4</sup>, Flávio Maciel Dias de Andrade, PT, MSc<sup>1,4</sup>, and Eduardo Eriko Tenório de França, PT, MSc<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiotherapy, Institute of Biology and Health, Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, Recife, PE, Brazil, <sup>2</sup>Intensive Care Unit and Department of Physiotherapy, Hospital Agamenon Magalhães – HAM, Recife, PE, Brazil, <sup>3</sup>Laboratory of Immunopathology Keizo Azami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife, PE, Brazil, and <sup>4</sup>Department of Physiotherapy, Faculdade Integrada do Recife-FIR, Recife, PE, Brazil

### Abstract

**Background:** Electrical muscle stimulation (EMS) is applied to critically ill patients in order to improve their muscle strength, thereby preventing hypotrophy and promoting functional recovery. **Objective:** To assess the effects of early EMS on the range of movement of the ankle joint, and on thigh and leg circumference in critically ill patients. **Methods:** This is a prospective randomized clinical trial comprising 11 patients undergoing mechanical ventilation. Before and after EMS the thigh and leg circumference in both lower limbs and the goniometry of the tibiotarsal joint were measured. The angle of 90° on the goniometer was taken as the standard neutral position (NP), with the arm fixed on the lateral malleolus of the ankle joint. Other measurements, namely dorsiflexion and plantar flexion, referred to as mobile arm, were taken from the NP. These recordings were obtained following an active contraction of the patients' muscles. **Results:** Compared with the electrostimulated limb, a difference in dorsiflexion of the control limb was observed (96.2 ± 24.9 versus 119.9 ± 14.1°;  $p = 0.01$ ). A girth of 10 cm of the leg was found in limb reduction when compared to the electrostimulated one (24.7 ± 3.1 versus 26.4 ± 4.0 cm;  $p = 0.03$ ). **Conclusions:** EMS used at low current intensity and for a short duration failed to prevent muscle atrophy in critically ill patients. However, we did find a significant improvement in active dorsiflexion of the ankle joint suggesting that it could help to prevent against stance plantar flexion in these patients.

### Keywords

Critical illness, electrical stimulation, muscle weakness

### History

Received 15 June 2012  
Revised 2 September 2013  
Accepted 13 October 2013  
Published online 23 December 2013

### Introduction

Muscle weakness and deconditioning are increasingly frequent in patients requiring prolonged mechanical ventilation (MV), and are associated with increased morbidity and mortality. These complications are multifactorial in origin, such as immobility in bed, sepsis, the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and exposure to pharmacological agents (Borges, Oliveira, Peixoto, and Almeida de Carvalho, 2009; De Jonghe et al, 2002; Garnacho-Montero et al, 2001). Seventy per cent of patients with chronic lung disorder admitted to the intensive care unit (ICU) (Cabric and Appel, 1987; Currier and Mann, 1983) showed a significant reduction in quadriceps muscle strength and exercise intolerance compared to healthy adults of the same (Hamilton, Killian, Summers, and Jones, 1995).

Herridge et al (2003) studied patients recovering from acute respiratory distress syndrome, and after 1 year observed functional impairment, which was attributed to loss of muscle mass,

proximal muscle weakness and fatigue. These factors were associated with the presence of equinus foot, adversely affecting these patients' return to work.

Goniometry is a method used by physical therapists to quantify joint limitation. Measurements of joint angles of the ankle in dorsiflexion and plantar flexion can demonstrate an improvement in the patient's functional recovery.

As an alternative to reversal of muscle weakness and deconditioning, electrical muscle stimulation (EMS) has been used as a therapeutic modality that involves the application of electrical current pulses through electrode surfaces in order to generate neural action potentials, which produce an artificial muscle contraction (Montenegro et al, 2005).

Gerovasili et al (2009a) demonstrated that an early (from the second day of hospitalization) deployment of a 45-min daily program of EMS of the lower limb was well tolerated and was able to mitigate the loss of muscle mass in critical patients, measured by means of ultrasonography. In this study, the authors describe some adverse effects of EMS, including muscle fatigue, skin hyperemia and burns related to high current intensities.

The application of EMS at the neuromuscular junction and around the muscle fibers produces contractions that prevent

Address correspondence to Dr Eduardo Eriko Tenório de França PT, MSc, Department of Physiotherapy, Institute of Biology and Health, Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, Rua do Príncipe s/n Boa vista Recife - PE, Recife, Brazil. E-mail: edueriko@ig.com.br

atrophy, improve blood circulation and alleviate the effects of prolonged immobility (Gondin, Guette, Ballay, and Martin, 2006; Jubeau et al, 2006; Maffiuletti et al, 2006; Marqueste, Hug, Decherchi, and Jammes, 2003). Such benefits may persist for up to 4–6 weeks after the end of the EMS treatment. Another great benefit of using EMS is that the cardiovascular system is not overloaded, thus allowing patients with severe respiratory failure to tolerate this type of training (Hayter, Coombes, Knez, and Brancato, 2005; Theurel, Lepers, Pardon, and Maffiuletti, 2007; Zanotti, Felicette, Maini, and Fracchia, 2003). Physical exercise can be combined with EMS in order to improve muscle strength (Currier and Mann, 1983; Hamilton, Killian, Summers, and Jones, 1995) and prevent loss of muscle mass, thereby reducing the length of ICU stay (Dobsák et al, 2006). This study therefore aimed to evaluate the effects of early EMS on the range of motion (ROM) of the ankle joint and on thigh and leg circumference in critically ill patients.

### Methods

The present study is a prospective randomized, blind clinical trial conducted in the general ICU of Agamenon Magalhães Hospital (HAM) between February 2011 and October 2011. The study was approved by the hospital's Ethics in Research Committee.

A comparative study was conducted using early and systematic protocol of EMS on the quadriceps and tibialis anterior muscles of a limb while the other was used as control, with passive mobilization of joints in all ranges of motion being performed on both limbs. The lower limb stimulated was chosen randomly using Microsoft Office Excel 2007 version.

### Patients

The sample consisted of individuals of both genders who were on MV for a period of up to 48 h. A survey was made of the medical records of patients admitted to the ICU for the purpose of recruiting volunteer patients meeting the inclusion criteria. The patients recruited were those who presented with: good cardiovascular reserve, demonstrated by the absence of electrocardiographic changes, without evidence of acute myocardial infarction or arrhythmia; good respiratory reserve, represented by the absence of respiratory distress signs; good gas exchange, identified by peripheral oxygen saturation of over 90%, for a fraction of inspired oxygen (FiO<sub>2</sub>) of less than 60%; and who had not participated in any kind of exercise program associated with the study in question.

The study excluded patients who: were younger than 18 years; pregnant; body mass index (BMI) >35 kg/m<sup>2</sup>; brain death; neuromuscular disease; use of cardiac pacemakers; vascular disease; or any type of fracture or skin lesions in the determined location of the electrode; patients who were not walking before admission; or who had been treated for cancer in the last six months (Routsis et al, 2010).

### Patient recruitment

A researcher made daily visits to the general ICU to select patients for the study, using a checklist. When the researcher identified a patient who met the eligibility criteria, the patient's family was approached and requested to authorize the patient's inclusion in the study. Upon family acceptance and the signing of the free and informed consent form, the procedures of data collection were started.

### Evaluation

After recruitment, the subjects were assessed in accordance with medical records, demographic information, medical history, BMI,

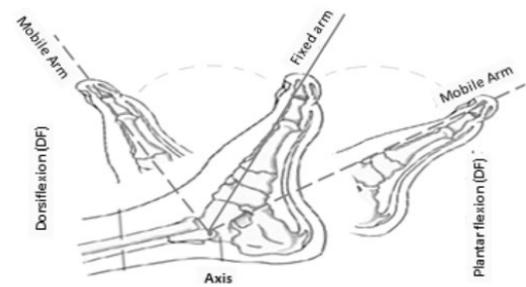


Figure 1. Direction finding of the ankle joint. Fixed arm (90° with the lateral malleolus) and mobile arms and dorsiflexion (DF) and plantar flexion (PF).

diagnosis, blood gas data and evaluation of their acute physiological and chronic health using the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II. Data related to the use of neuromuscular blocking agents, steroids, sedatives, and vasoactive drugs, were also collected.

The peripheral muscle strength of the lower limbs of all patients selected for the study was evaluated after the withdrawal of sedation. The initial evaluation of the protocol was made on the first awakening and the final one made when the patient attained the degree 4 of muscle strength on the Oxford Score Rating Scale, with values ranging from (0) to (5) where: [0] = no motion (complete paralysis); [1] = sketch of motion without contraction; [2] = limb movement with gravity eliminated; [3] = active movement against gravity without resistance; [4] = active movement against gravity and against resistance; and [5] = normal muscle strength. Peripheral muscle strength of the lower limbs was also evaluated through the Medical Research Council – MRC score, with values ranging from [0] tetraplegia to [30] normal muscular strength. The movements evaluated were hip flexion, knee extension and ankle dorsiflexion (Marqueste, Hug, Decherchi, and Jammes, 2003).

Both groups were evaluated at baseline and on completion of EMS. The circumference of the lower limbs were assessed at the distal thigh of both limbs: 5 cm, 10 cm and 15 cm above the base of the patella; and in the leg: 5 cm, 10 cm and 15 cm above the lateral malleolus (França et al, 2011).

The angulation of the ankle was also assessed with a goniometer in the movements of dorsiflexion and plantar flexion, in which the goniometer was positioned as follows: Fixed arm – parallel to the lateral surface of the fibula; mobile arm – parallel to the lateral surface of the fifth metatarsal; and Axis – the ankle joint, near the lateral malleolus, but this measurement was performed only at the time of discharge from the ICU (Figure 1). The angle of 90° on the goniometer was taken as standard neutral position (NP), with the arm fixed on the lateral malleolus of the ankle joint. Other measurements, namely dorsiflexion (DF) and plantar flexion (PF), referred to as mobile arm, were taken from the NP. These recordings were obtained following an active contraction of the patients' muscles.

The EMS was applied by two researchers, physical therapists trained in the department. Two other researchers (blinded to treatment) carried out the evaluation of peripheral muscle strength, circumference and goniometry.

Before starting the protocol lengthening of the hamstring muscle group, hip adductors and abductors was conducted. Each movement was performed three times for 30 s in the right and left legs.

DOI: 10.3109/09593985.2013.869773

### Intervention

The EMS protocol was systematically performed on the belly of the quadriceps muscles (vastus lateralis, rectus femoris and vastus medialis) and the tibialis anterior, daily, until the patient attained a force of 4 on the scale of muscle strength for the muscle stimulated, assessed after removal from sedation. The electrodes were placed on their muscle motor points stimulated and marked for the exact location of EMS, thus allowing a mark to identify the motor point of the muscle stimulated.

The stimulator used (Dualpex SPORT 961; Quark Medical Products; Piracicaba, São Paulo, Brazil) delivered biphasic, symmetric impulses of 50 Hz, 400  $\mu$ s pulse duration, for 9 s on (including 2 s of rise time, 5 second of contraction and 2 s of fall time) and 9 s off at intensities that resulted in visible contractions. In case of doubt, contraction was confirmed by palpation of the muscles involved (Routsi et al, 2010). The session length was 20 min for each muscle group. The 20-min duration of stimulation was predetermined by the equipment used to strengthen the legs, which was not adjustable.

In both limbs passive mobilization of joints of the lower limbs was performed, the movements being as follows: flexion and extension of the fingers; dorsiflexion, plantar flexion, inversion and eversion of the ankle; knee flexion and extension; and flexion, abduction, adduction, internal and external rotation of the hip. For each joint 10 mobilizations were performed throughout the arc of movement.

The criteria for discontinuation of the protocol were signs of fatigue, exemplified by the absence of visible muscle contraction, or hyperemia, demonstrated by signs of redness at the stimulation site of the electrodes. These signs were continuously monitored by the examiner applying the EMS.

### Statistical analysis

The sample size was determined by classical statistical terms, with type I error associated with the null hypothesis. The likelihood of a type I error is designated  $\alpha$  (alpha) at a predefined significance level of 0.05 ( $\alpha = 0.05$ ).

The variables are presented using tables and figures, including descriptive measurements, such as minimum and maximum value, mean and standard deviation. The Kolmogorov–Smirnov test was

### Electrical muscle stimulation in critically ill patients 3

employed to test the assumption of normality of the study variables.

The independent Student *t*-test was used for the comparative analysis of independent and paired samples, and the Wilcoxon, Mann–Whitney, one-way ANOVA and Tukey post-tests when appropriate.

All conclusions were based on a significance level of 5%, using GraphPad Prism 4 and Microsoft Office Excel 2007.

### Results

During the study period, 128 patients were admitted to the ICU. Of these, 117 were ineligible for the study protocol. The 11 remaining patients were divided randomly into left lower limb (LLL) ( $n = 4$ ) and right lower limb (RLL) ( $n = 7$ ) (Figure 2).

Table 1. Clinical diagnosis, use of neuromuscular blocker (NMB) and use of antibiotics and mean  $\pm$  standard deviation of age, APACHE II score and days of stay in ICU, days of mechanical ventilation (MV), days to arouse, use of vasoactive drug and use of sedation.

Variables	
Clinical diagnosis	
Eclampsia	2 (18.2)
Haemorrhagic dengue fever	1 (9.1)
HELLP syndrome	1 (9.1)
Uraemic syndrome	1 (9.1)
Seizures	1 (9.1)
Diabetic ketoacidosis	1 (9.1)
Sepsis	4 (36.3)
Use of NMB	3 (27.3)
Use of antibiotics	6 (54.5)
Age (years)	34.0 $\pm$ 17.3
APACHE II score	15.7 $\pm$ 4.5
Days of treatment	10.2 $\pm$ 9.0
Days of stay in ICU	19.5 $\pm$ 21.3
Days of MV	9.6 $\pm$ 8.3
Days to arouse	3.1 $\pm$ 3.5
Days on vasoactive drugs	1.0 $\pm$ 1.9
Days of sedation	6.5 $\pm$ 5.8

The values for clinical diagnosis, use of NMB and use of antibiotics are expressed as absolute numbers (%). The other values are expressed as means  $\pm$  standard deviations.

Physiother Theory Pract Downloaded from informahealthcare.com by 189.1.2.31 on 01/03/14  
For personal use only.

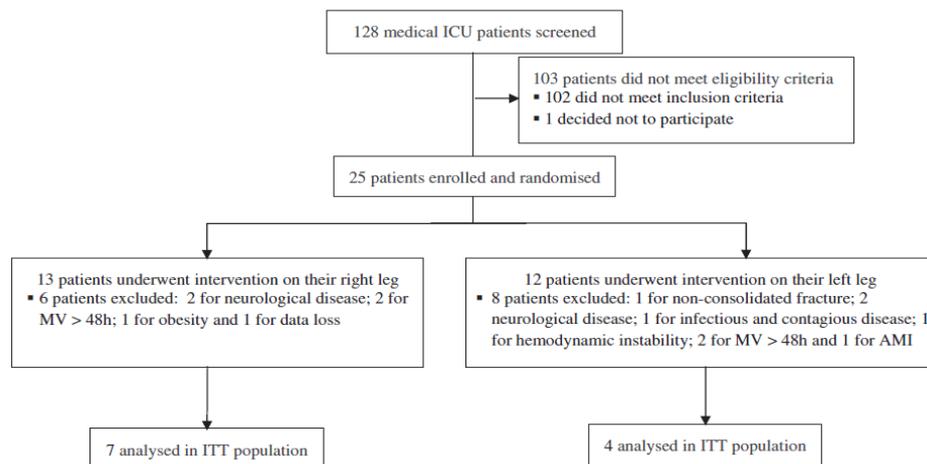


Figure 2. Trial profile. ICU, intensive care unit; MV, mechanical ventilation; AMI, acute myocardial infarction; ITT, intention-to-treat.

Table 2. Mean  $\pm$  standard deviation of tibiotarsal joint angles in the neutral position, dorsiflexion and plantar flexion in control and electrostimulated limbs after the study protocol.

Variables	Control <i>p</i> * Value limb	Electrostimulated limb	<i>p</i> * Value
NP (degree)	126.7 $\pm$ 10.6	119.8 $\pm$ 9.9	0.13
DF (degree)	119.9 $\pm$ 14.1	96.2 $\pm$ 24.9†	0.01
PF (degree)	145.3 $\pm$ 17.9	136.5 $\pm$ 13.2	0.20

\*Student *t*-test for independent samples; NP, neutral position; DF, dorsiflexion; PF, plantar flexion.

†*p* < 0.05 when compared NP to PF (one-way test ANOVA and Tukey's test).

Table 3. Variation of circumference of control and electrostimulated lower limbs.

	Control limb	Electrostimulated limb	<i>p</i> * Value
Leg			
5 cm (cm)	-0.9 $\pm$ 1.7	-1.8 $\pm$ 2.3	0.31
10 cm (cm)	1.0 (-0.75 to -1.0)	-1.0 (-2 to -0)	0.21
15 cm (cm)	-1.8 $\pm$ 2.6	-1.7 $\pm$ 2.6	0.93
Thigh			
5 cm (cm)	-0.9 $\pm$ 3.5	-1.5 $\pm$ 5.1	0.76
10 cm (cm)	-1.2 $\pm$ 3.6	3.0 $\pm$ 2.8	0.008
15 cm (cm)	-1.4 $\pm$ 3.4	-0.6 $\pm$ 4.3	0.651

Table 4. Medical Research Council (MRC) score for lower limb movements of hip flexion, extension of the knee and ankle dorsiflexion of control and electrostimulated limbs before and after the study protocol.

	Control limb		<i>p</i> * Value	Electrostimulated limb		<i>p</i> * Value
	Before	After		Before	After	
MRC	11.9 $\pm$ 3.8	12.8 $\pm$ 3.9	0.18	12.0 $\pm$ 4.0	12.6 $\pm$ 4.1	0.18

\*Student *t*-test for paired samples.

Table 1 presents the patients' characterization for: diagnosis; use of neuromuscular blocker (NMB); use of antibiotic; age; APACHE II score; days of treatment; days of ICU stay; days of MV; days to arouse; and days of use of vasoactive drugs and sedation. All of these parameters evaluated at baseline were intended to characterize the study population.

The angulation of the tibiotarsal joint in the control and stimulated members is shown in Table 2. The angle of dorsiflexion was significantly higher in the electrically stimulated limb compared with the control limb (119.9  $\pm$  14.1 versus 96.2  $\pm$  24.9 degrees; *p* = 0.01), which indicates a higher active dorsiflexion of the ankle joint.

The circumference measures of the leg and thigh in both the control and electrostimulated limbs are in Table 3. The circumference measures obtained at the 10 cm of the thigh were significantly lower in control compared with the electrostimulated lower limbs, after the study protocol. However, at the 5 and 15 cm of the thigh circumference, no significant differences in control and electro-stimulated limbs were observed before or after the study protocol. No differences were found for circumference measures of the leg at 5, 10 and 15 cm.

The MRC score for the lower limb, obtained by performing hip flexion, knee extension and ankle dorsiflexion of the control and electrostimulated limbs before and after the study protocol are

Table 5. Intensity used during electrical stimulation at the beginning and end of the study protocol.

	Minimum	Maximum	Mean	Standard deviation	<i>p</i> * Value
Beginning of the protocol	22.0	60.0	39.4	13.0	0.00
End of the protocol	18.0	48.0	30.0	9.3	

\*Student *t*-test for samples varied.

shown in Table 4, and there were no statistical differences between the groups. EMS was maintained until the patient attained muscular strength  $\geq 4$  for each joint of the lower limb. All the patients studied attained this value, and EMS was then halted.

Table 5 presents the intensity used during electrical stimulation at the beginning and end of the study protocol. A significant reduction in intensity was observed at the end of the study protocol (30.0  $\pm$  9.3 versus 39.4  $\pm$  13.0 mA, respectively).

## Discussion

In this randomized controlled study, we were able to observe an increase in the ROM of active dorsiflexion in patients undergoing EMS compared to the nonelectrostimulated limb. This result demonstrates the importance of the use of EMS in these patients with the goal of maintaining ankle joint ROM, thereby reducing limitations and facilitating the process of functional recovery.

In addition, the EMS of the quadriceps and tibialis anterior of critically ill patients undergoing MV resulted in the maintenance of thigh circumference values in both groups before and after application of the study protocol. For the leg circumference, the values decreased, which may indicate a decrease in muscle mass in both limbs, with or without EMS. The general interpretation is that EMS did not induce change in muscle circumference in the present study.

Several factors may affect functional status and result in a longer period of MV and hospitalization with consequent loss of muscle mass. Examples of these factors are bed immobility, clinical disorders, and exposure to pharmacological agents. These negative factors can also increase the chances of critically ill patients developing paresis, with major damage to the musculoskeletal system (França et al. 2012).

In the present study, although the mean age of the patients was relatively low, they had other co-morbidities (i.e. the presence of sepsis) and use of NMB, antibiotics and sedatives that could have worsened their neuromuscular condition (De Jonghe, Lacherade, Sharshar, and Outin, 2009; Latronico and Rasulo, 2010). These patients also had a mean APACHE II score of around 15, which corresponds to a mortality risk of around 25%.

Physical deconditioning and muscle weakness occur in 25% to 60% of patients, who regain normal consciousness after 1 week of MV, ranging from mild tetraparesis to severe tetraplegia. As a result, managing patients with ICU-acquired weakness (ICUAW) is part of the everyday clinical experience of every intensive care worker (De Jonghe, Lacherade, Sharshar, and Outin, 2009).

Research shows that EMS can be used in the prevention and treatment of muscle atrophy, resulting in an increased oxidative capacity, improved microcirculation and decreased levels of anaerobic enzymes (Gerovasili et al. 2009b; Nuhr et al. 2003; Vivodtzev, Lacasse, and Maltais, 2008). EMS has been an alternative treatment used to counteract the constraints of soft tissue and muscle weakness as well as, to preserve the ROM of joints. The improvement in muscle performance is facilitated by electrical stimulation through the mobilization of the joint in the

ROM available or through the increase in amplitude. In the absence of voluntary movements, functional electrical stimulation can activate the muscles to move the joint passively in any direction (Falcão, Guimarães, and Amaral, 2006). EMS has also been used as a preventive therapeutic method in dorsiflexor foot deformities, such as equinovarus (Martins, Guimarães, Vitorino, and Souza, 2004).

In this study, during the implementation of EMS, we observed a greater movement in dorsiflexion of the ankle joint from the NP in the electrostimulated group than in the control group. We believe that EMS applied to the tibialis anterior muscle has been fundamental in maintaining the muscle tone of the antigravity muscle and that has hampered the predominance of flexor muscles in the plantar flexion position, so common in critical patients. This finding is in agreement with that of Schuster, Sant, and Dalbosco (2007), who performed a study in hemiparetic patients, using EMS on the tibialis anterior for 30 min over a period of 45 days, 3 times a week, totaling 20 treatments. That study set out to assess the effects of electrical stimulation in strength and muscle tone, range of motion and gait. EMS has been considered effective in improving active range of motion and passive dorsiflexion, muscle re-education, and the reduction of spasticity and gait.

In relation to the circumference variation data of our study, we observed a significant change only in the thigh, in both control and EMS limbs, in the measurements taken at 10 cm. These findings demonstrate that, in our study, EMS was not sufficient to mitigate the loss of muscle mass measured by circumference of the lower limbs.

Routsi et al (2010) studied the effectiveness of EMS in the prevention of polyneuropathy in critical patients divided into control and EMS groups, 71 patients being electrostimulated simultaneously in the vastus lateralis and vastus medialis quadriceps and long fibular of both lower limbs. In this study, the intensity of the electrical current was sufficient to cause visible contraction, and the duration of electrostimulation was 55 min. The MRC scores were higher in the EMS group than in the controls, resulting in a shorter period of weaning, suggesting that daily sessions of EMS may prevent polyneuropathy in critical patients and facilitate weaning. We therefore consider a limitation of our study in that we did not increase the current intensity, and worked with a 20-min period of electrostimulation preadjusted by the equipment. These factors may have been decisive in the failure to obtain a gain in strength and cross-sectional area of the muscle stimulated.

The circumference findings may justify the absence of difference in lower limb strength, evaluated through the MRC score for the control limb as compared to the electrostimulated one before and after the study protocol shown in Table 4. Rodriguez et al (2012) conducted a study with 16 patients using EMS twice daily in the biceps brachii in a half-body until the withdrawal of sedation in order to assess the effects of EMS in septic patients that were on MV. The arm and thigh circumference was measured by ultrasound and muscle strength evaluated through the MRC score. Muscle strength was significantly higher in the electrostimulated limb than in the control limb, but no differences were found in relation to the diameter of the arm and thigh.

Table 5 depicts the intensity used for EMS before and after the study protocol. A significantly lower value of stimulation intensity was observed at the end of the study protocol. These findings may reflect the initial decreased sensitivity to stimulation of electrical current observed in patients with acute disease, requiring a greater current intensity to produce visible contraction compared to the final treatment sessions, when patients were at muscular strength grade 4. The amplitude or intensity is a

measure of magnitude of the electrical current and may be constant or adjustable. The greater the intensity of stimulation, the greater the number of muscle fibers activated with the resulting effect on physical training. Optimum intensity has been considered as that which causes a strong visible twitch, a level of discomfort that is tolerated by the patient (Rondelli, 2008). These findings are in agreement with the study of Rodriguez et al (2012), which showed a significant improvement in muscle strength in the electrically stimulated limb compared to the control.

The main limitation of the present study is the small number of patients comprising the sample. This may possibly account for the fact that we did not observe any differences in circumference or in the evaluation of the MRC score between the limbs treated with EMS and the controls. Another limitation of our study was that some other method could have identified more accurately the loss of muscle strength characteristic of critically ill bed-bound patients.

### Conclusion

The present study demonstrated that EMS is effective in maintaining amplitude of movement of the ankle joint, promoting greater mobility and possibly functionality, and can be applied to improve active dorsiflexion.

Another important finding is there was no gain in the strength and cross-sectional area of the muscle stimulated, probably due to insufficient intensity of stimulation and duration of electrostimulation preadjusted by the equipment. This may be considered as a major limitation of the present study.

Finally, this technique was well tolerated, inexpensive and did not require the cooperation of the patient. However, further studies are necessary to allow the development of the technique and corroboration of the results of this study.

### Declaration of interest

The authors report no declaration of interest.

### References

- Borges VM, Oliveira LR, Peixoto E, Almeida de Carvalho NA 2009 Fisioterapia motora em pacientes adultos em terapia intensiva. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 21: 446–452.
- Cabric M, Appel HJ 1987 Effect of electrical stimulation of high and low frequency on maximum isometric force and some morphological characteristics in man. *International Journal of Sports Medicine* 8: 256–260.
- Currier DP, Mann R 1983 Muscular strength development by electrical stimulation in normal individuals. *Physical Therapy* 63: 915–921.
- De Jonghe B, Lacherade JC, Sharshar T, Outin H 2009 Intensive care unit-acquired weakness: Risk factors and prevention. *Critical Care Medicine* 37: S309–S315.
- De Jonghe B, Sharshar T, Lefaucheur JP, Authier FJ, Durand-Zaleski I, Boussarsar M, Cerf C, Renaud E, Mesrati F, Carlet J, Raphaël JC, Outin H, Bastuji-Garin S; Groupe de Réflexion, d'Etude des Neuromyopathies en Réanimation 2002 Paresis acquired in the intensive care unit: A prospective multicenter study. *Journal of American Medical Association* 288: 2859–2867.
- Dobsák P, Nováková M, Fiser B, Siegelová J, Balcárková P, Spínarová L, Vítovec J, Minami N, Nagasaka M, Kohzuki M, Yambe T, Imachi K, Nitta S, Eicher JC, Wolf JE 2006 Electrical stimulation of skeletal muscles: an alternative to aerobic exercise training in patients with chronic heart failure? *International Heart Journal* 47: 441–453.
- Falcão LFR, Guimarães HP, Amaral JL 2006 Medicina intensiva para graduação. In: Falcão LFR, Guimarães HP (eds) *Indicador prognóstico em UTI (APACHE II)*, pp 345–348. São Paulo, Editora Ateneu.
- França EE, Ferrari FR, Fernandes PV, Cavalcanti R, Duarte A, Aquim EE, Damasceno MC 2012 Physical therapy in critically ill adult patients: Recommendations from the Brazilian Association of Intensive

- Care Medicine, Department of Physical Therapy. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 24: 6–22.
- França JS, Costa JM, Campos JC, Moura WE, Soares W 2011 Aplicabilidade de um Protocolo Fisioterápico no Pós-operatório de Ligamento Cruzado Anterior. *Acta Biomedica Brasiliensia* 2: 11–16.
- Garnacho-Montero J, Madrazo-Osuna J, García-Garmendia J, Ortiz-Leyba C, Jiménez-Jiménez F, Barrero-Almodóvar A, Garnacho-Montero MC, Moyano-Del-Estad MR 2001 Critical illness polyneuropathy: Risk factors and clinical consequences. A cohort study in septic patients. *Intensive Care Medicine* 27: 1288–1296.
- Gerovasili V, Stefanidis K, Vitzilaios K, Karatzanos E, Politis P, Koroneos A, Chatzimichail A, Routsis C, Roussos C, Nanas S 2009a Electrical muscle stimulation preserves the muscle mass of critically ill patients: A randomized study. *Critical Care* 13: R161. doi: 10.1186/cc8123.
- Gerovasili V, Tripodaki E, Karatzanos E, Ptsolis T, Markaki V, Zervakis D, Routsis C, Roussos C, Nanas S 2009b Short-term systemic effect of electrical muscle stimulation in critically ill patients. *Chest* 136: 1249–1256.
- Gondin J, Guette M, Ballay Y, Martin A 2006 Neural and muscular changes to detraining after electrostimulation training. *European Journal of Applied Physiology* 97: 165–173.
- Hamilton AL, Killian KJ, Summers E, Jones NL 1995 Muscle strength, symptom intensity and exercise capacity in patients with cardiorespiratory disorders. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 152: 2021–2031.
- Hayter TL, Coombes GS, Knez WL, Brancato TL 2005 Effects of electrical muscle stimulation on oxygen consumption. *Journal of Strength and Conditioning Research* 19: 98–101.
- Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, Matte-Martyn A, Diaz-Granados N, Al-Saïdi F, Cooper AB, Guest CB, Mazer CD, Mehta S, Stewart TE, Barr A, Cook D, Slutsky AS; Canadian Critical Care Trials Group 2003 One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine* 348: 683–693.
- Jubeau M, Zory R, Gondin J, Martin A, Maffiuletti NA 2006 Late neural adaptations to electrostimulation resistance training of the plantar flexor muscles. *European Journal of Applied Physiology* 98: 202–211.
- Latronico N, Rasulo FA 2010 Presentation and management of ICU myopathy and neuropathy. *Current Opinion in Critical Care* 16: 123–127.
- Maffiuletti NA, Zory R, Miotti D, Pellegrino MA, Jubeau M, Bottinelli R 2006 Neuromuscular adaptations to electrostimulation resistance training. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation* 85: 167–175.
- Marqueste T, Hug F, Decherchi P, Jammes Y 2003 Changes in neuromuscular function after training by functional electrical stimulation. *Muscle and Nerve* 28: 181–188.
- Martins FL, Guimaraes LH, Vitorino DF, Souza LC 2004 Eficácia da eletroestimulação funcional na amplitude de movimento de dorsiflexão de hemiparéticos. *Revista Neurociências* 12: 103–109.
- Montenegro EJ, Rodrigues EA, Rocha TD, Cury JR, Mendes AC, Sales AR 2005 Estudo da área e localização dos eletrodos durante a estimulação elétrica neuromuscular do músculo quadríceps femoral. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco* 50: 122–127.
- Nuhr M, Crevenna R, Gohlseh B, Bitner C, Pleiner J, Wiesinger G, Fialka-Moser V, Quittan M, Pette D 2003 Functional and biochemical properties of chronically stimulated human skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology* 89: 202–208.
- Rodriguez PO, Setten MPT, Maskin LP, Bonelli I, Vidomlansky SR, Attie S, Frosiani SL, Kozima S, Valentini R 2012 Muscle weakness in septic patients requiring mechanical ventilation: Protective effect of transcutaneous neuromuscular electrical stimulation. *Journal of Critical Care* 27: 319.e1–319.e8.
- Rondelli RR 2008 Intensidade constante ou ajustável de corrente elétrica não elicit diferentes níveis de fadiga do músculo quadríceps femoral durante sessões de estimulação elétrica neuromuscular em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica leve-moderada. Universidade Nove de Julho.
- Routsis C, Gerovasili V, Vasileaidis I, Karatzanos E, Ptsolis T, Markaki V, Zervakis D, Nanas S 2010 Electrical muscle stimulation prevents critical illness polyneuromyopathy: A randomized parallel intervention trial. *Critical Care* 14: R74. doi: 10.1186/cc8987.
- Schuster RC, Sant CR, Dalbosco V 2007 Efeitos da estimulação elétrica funcional (FES) sobre o padrão de marcha de um paciente hemiparético. *Acta Fisiatrica* 14: 82–86.
- Theurel J, Lepers R, Pardon L, Maffiuletti NA 2007 Differences in cardiorespiratory and neuromuscular responses between voluntary and stimulated contractions of the quadriceps femoris muscle. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 157: 341–347.
- Vivodtzev I, Lacasse Y, Maltais F 2008 Neuromuscular electrical stimulation of the lower limbs in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention* 28: 79–91.
- Zanotti E, Felicette G, Maini M, Fracchia C 2003 Peripheral muscle strength training in bed-bound patients with COPD receiving mechanical ventilation: Effect of electrical stimulation. *Chest* 124: 292–296.

**ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO**

“Oxidative stress and immune system analysis after cycle ergometer use in critical patients”

**Clinics**, Qualis 2014 (B2 – Medicina 1 e B3 – Ciências Biológicas 1)

De: [onbehalfof+clinics+hc.fm.usp.br@manuscriptcentral.com](mailto:onbehalfof+clinics+hc.fm.usp.br@manuscriptcentral.com) <[onbehalfof+clinics+hc.fm.usp.br@manuscriptcentral.com](mailto:onbehalfof+clinics+hc.fm.usp.br@manuscriptcentral.com)> em nome de CLINICS <[onbehalfof+clinics+hc.fm.usp.br@manuscriptcentral.com](mailto:onbehalfof+clinics+hc.fm.usp.br@manuscriptcentral.com)>  
Enviado: sexta-feira, 16 de dezembro de 2016 19:01  
Para: [edueriko@hotmail.com](mailto:edueriko@hotmail.com)  
Cc: [clinics@hc.fm.usp.br](mailto:clinics@hc.fm.usp.br)  
Assunto: CLINICS - Decision on Manuscript ID CLINICS-2016-0296.R2

16-Dec-2016

Dear Dr. França:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Oxidative stress and immune system analysis after cycle ergometer use in critical patients" in its current form for publication in CLINICS.

The publication fee for this article is R\$ 1.500,00. Please print this letter, complete and sign the DECLARAÇÃO below and return it attached to an email to our Editorial Office ([clinics@hc.fm.usp.br](mailto:clinics@hc.fm.usp.br)).

As stated in our Instructions to Authors ([www.clinics.org.br](http://www.clinics.org.br)), please send the current version of your manuscript to the company American Journal Experts (AJE) for revision. We have been working with AJE for many years and are very satisfied with the quality of their work. Premium Editing is mandatory and you are entitled to a 20% discount. Please make sure you send all sections related to the manuscript for revision: title, running title, abstract, authors contributions, text, references, figures, tables and legends.

Website: <https://www.aje.com>

---

AJE - Editing, Formatting, Translation and Illustration Services for scientific researchers by academic experts | AJE | American Journal Experts

[www.aje.com](http://www.aje.com)

AJE helps research break through with top-quality author services from experienced academics. We can help prepare your manuscript, figures, posters, and more.

## Oxidative stress and immune system analysis after cycle ergometer use in critical patients

Eduardo Eriko Tenório de França,<sup>I,II,IV,\*</sup> Luana Carneiro Ribeiro,<sup>II,IV</sup> Gabriela Gomes Lamemha,<sup>IV</sup> Isabela Kalline Fidelix Magalhães,<sup>IV</sup> Thainá de Gomes Figueiredo,<sup>IV</sup> Marthley José Correia Costa,<sup>I</sup> Ubiracé Fernando Elihimas Júnior,<sup>V</sup> Bárbara Luana Feitosa,<sup>I</sup> Maria do Amparo Andrade,<sup>II</sup> Marco Aurélio Valois Correia Júnior,<sup>III</sup> Francimar Ferrari Ramos,<sup>IV</sup> Célia Maria Machado Barbosa de Castro<sup>VI</sup>

<sup>I</sup>Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Fisioterapia, Recife/PE, Brazil. <sup>II</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Fisioterapia, Recife/PE, Brazil. <sup>III</sup>Universidade de Pernambuco (UPE), Fisioterapia, Recife/PE, Brazil. <sup>IV</sup>Hospital Agamenom Magalhães (HAM), Fisioterapia, Recife/PE, Brazil. <sup>V</sup>Hospital Agamenom Magalhães (HAM), UTI Geral, Medicina Intensiva, Recife/PE, Brazil. <sup>VI</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Microbiologia, LIKA, Recife/PE, Brazil.

1

**OBJECTIVE:** The passive cycle ergometer aims to prevent hypotrophy and improve muscle strength, with a consequent reduction in hospitalization time in the intensive care unit and functional improvement. However, its effects on oxidative stress and immune system parameters remain unknown. The aim of this study is to analyze the effects of a passive cycle ergometer on the immune system and oxidative stress in critical patients.

**METHODS:** This paper describes a randomized controlled trial in a sample of 19 patients of both genders who were on mechanical ventilation and hospitalized in the intensive care unit of the Hospital Agamenom Magalhães. The patients were divided into two groups: one group underwent cycle ergometer passive exercise for 30 cycles/min on the lower limbs for 20 minutes; the other group did not undergo any therapeutic intervention during the study and served as the control group. A total of 20 ml of blood was analysed, in which nitric oxide levels and some specific inflammatory cytokines (tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and interleukins 6 (IL-6) and 10 (IL-10)) were evaluated before and after the study protocol.

**RESULTS:** Regarding the demographic and clinical variables, the groups were homogeneous in the early phases of the study. The nitric oxide analysis revealed a reduction in nitric oxide variation in stimulated cells ( $p=0.0021$ ) and those stimulated ( $p=0.0076$ ) after passive cycle ergometer use compared to the control group. No differences in the evaluated inflammatory cytokines were observed between the two groups.

**CONCLUSION:** We can conclude that the passive cycle ergometer promoted reduced levels of nitric oxide, showing beneficial effects on oxidative stress reduction. As assessed by inflammatory cytokines, the treatment was not associated with changes in the immune system. However, further research in a larger population is necessary for more conclusive results.

**KEYWORDS:** Cytokines; Oxidative; Musculoskeletal.

França EE, Ribeiro LC, Lamemha GG, Magalhães IK, Figueiredo TG, Costa MJ, et al. Oxidative stress and immune system analysis after cycle ergometer use in critical patients. *Clinics*. 2017;72(3):000-000

Received for publication on September 13, 2016; First review completed on November 9, 2016; Accepted for publication on December 16, 2016

\*Corresponding author. E-mail: edueriko@hotmail.com

### INTRODUCTION

Critical patients who require mechanical ventilation (MV) for an extended time period due to underlying disease and adverse effects of drugs undergo an important functional loss. The long immobilization period causes severe osteomyoarticular system dysfunction and is increasingly frequent in these patients (1,2). These irregularities create muscle function losses

ranging from a daily decline of 1.3 force to 3 - 10% during an entire week of immobility (3).

Immobilization in bed and increased MV dependence may adversely affect several organs and systems, leading to the following consequences: muscle contractures; functional loss; reduced maximal oxygen uptake (VO<sub>2</sub> Max); muscle weakness in the intensive care unit (ICU); deep venous thrombosis; pressure ulcers; pneumonia; atelectasis; bone demineralization; and changes in the emotional state such as anxiety, apathy and depression (4).

Muscle weakness, which is common in critical patients, is associated with an inflammatory dysregulation that appears to contribute to myopathy. The mechanism for muscle decay due to immobility has not yet been completely clarified. Two molecular interactions are involved: oxidative stress and selected proinflammatory cytokines. It is believed that this

Copyright © 2017 CLINICS – This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium or format, provided the original work is properly cited.

No potential conflict of interest was reported.

DOI:



synergy between oxidative stress, inflammatory cytokines and inactivity causes or accelerates muscular atrophy (5,6).

Many studies have been developed with the objective of preventing the deleterious effects of ICU-acquired paresis or to minimize it, as an alternative therapy. Amongst the recommended procedures are passive exercises and/or activities, daily sedation suspension and reduced infusion of drugs such as neuromuscular blockers and corticosteroids, the maintenance of homeostasis of electrolytes and nutritional intake (7).

The effects of physical exercise in critical patients for the prevention of atrophy and muscle strength improvement with a consequent reduction in hospitalization time in intensive care and functional improvement have rapidly expanded in recent years. However, changes in oxidative stress and immune system parameters of these patients are not well defined and require further study, thus justifying the aim of this research of improving our understanding of the effect of isolated passive cycle ergometry use in critical patients. Therefore, this study analyses the oxidative stress and the immune system parameters after passive cycle ergometry use on lower limbs in critical patients.

## ■ MATERIALS AND METHODS

This was a randomized controlled trial, with a sample consisting of 19 MV patients of both genders hospitalized in the ICU of Hospital Agamenom Magalhães (HAM) who met the inclusion criteria. The study protocol was conducted in the ICU of HAM, but the blood analysis was performed in the laboratory of Immunology Keizo Asami (LIKA) at the Universidade Federal de Pernambuco. This study was approved by the Ethics and Research Committee (ERC) of the hospital under CAAE number 04563612.5.0000.5197, and all legal guardians of the patients signed informed consent (TFCC).

The patients who underwent MV presented a good cardiovascular reserve, demonstrated by less than 20% heart rate (HR) variability, systolic blood pressure (SBP) less than 200 mmHg or greater than 90 mmHg, normal electrocardiogram (no evidence of acute myocardial infarction or arrhythmia) and a good respiratory reserve, demonstrated by a peripheral oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>) greater than 90% and an inspired fraction of oxygen (FiO<sub>2</sub>) less than 60%, without signs of respiratory distress and a respiratory rate (RR) less than 25 ipm. Other clinical parameters necessary for inclusion in this study were as follows: stable haemoglobin of >7 g/dL, stable platelet count of >20,000 cells/mm<sup>3</sup>, white blood cell count of 4,300 - 10,800 cells/mm<sup>3</sup>, body temperature <38°C and blood glucose levels of 3.5 - 20 mmol/L. Other parameters included an acceptable patient appearance, pain, fatigue, shortness of breath and emotional status; a stable conscious state, no other neurological contraindications, no orthopaedic contraindications, no recent SSG / flap to lower limbs or trunk, medically stable without vasoactive drugs and/or minimal doses, excessive weight able to be safely managed, no attachments that contraindicated mobilisation, safe environment, appropriate staffing and expertise and patient consent.

Patients who presented with hemodynamic instability, the inability to walk without assistance before acute disease in the ICU, under 21 years old, pregnant women, patients with a body mass index (BMI) greater than 35 Kg/m<sup>2</sup> (2), neuromuscular disease or vascular disease, cerebrovascular

accident history, non-consolidated fractures or any osteo-myoearticular limitation that precludes cycle ergometry use were excluded from the study.

After being recruited to the study, the participants were evaluated through medical records, demographic information, medical history and diagnosis. Data on neuromuscular blockers, sedatives and vasoactive drugs were also collected.

When this initial review of all patients was completed, they were submitted to blood collection by central venous access, both before and 1 hour after the study protocol finalization. For each patient, a total of 20 ml of blood was collected with vacuum tubes (Vacutainer®) DIPOTASSIUM EDTA (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil) to evaluate the oxidative stress and immune system parameters as indicated by the cytokines tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and interleukins 6 (IL-6) and 10 (IL-10).

Oxidative stress was evaluated with EDTA in monocytes obtained from the peripheral blood. The blood was diluted at a ratio of 1:2:00 pm with sterile PBS culture medium at a room temperature of 22 to 25° C (10 ml +10 ml blood in PBS). A total of 10 ml of histopaque (1077-SIGMA) was added to 20 ml of the suspension, and all contents were centrifuged for 30 minutes at 1,600 rpm (25° C). Soon after, the plasma was aspirated, and the layer formed by the cells was collected (PBMC) and transferred to another test tube. The same amount of aspirated PBS was added and centrifuged for 15 minutes under the same conditions as before. The supernatant was decanted and sedimented in 1 ml of RPMI 1640 medium containing 3% bovine foetal serum and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin). The suspension calculation was performed in a Neubauer chamber assuming the rate of adding a suspension of cells and trypan blue dye in a 1:10 dilution. This dye was used for cell calculation and for assessing their viability. It was standardized to a concentration of  $1 \times 10^6$  cells for each 1 ml of culture medium from the measurements.

### Nitric oxide (NO) production in cultured monocytes treated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS)

In each group, the concentration was adjusted to  $1 \times 10^6$  cells in 1 ml of culture medium to each well. The cells were treated at a dose of 10  $\mu$ g/ml of LPS for 24 hours. The NO evaluation release was performed using the GRIESS method. First, 50  $\mu$ l of GRIESS reagent (1 g of sulphanilamide, Sigma 9251; 0.1 g of N-(naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, Sigma 5889; 2.5 ml of phosphoric acid PA; and qsp 100 ml of distilled water) was added. Then, the plate was incubated for 10 minutes in the dark. The reading was performed at 540 nm in an ELISA reader (Dynatech MR 5000). The sensitivity test threshold was 1.56  $\mu$ M.

### Analysis of immune system parameters by quantification of IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ and IFN- $\gamma$

Serum levels of IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were determined using ELISA commercial kits for IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (BioSource®, Nivelles, Belgium, Europe) according to the manufacturer's instructions. In this technique, a specific monoclonal antibody is adsorbed to the plate. After the serum sample addition of the mediator to be dosed, during incubation, the molecules of antigens settle to the antibodies adsorbed to the plate. Through washing, any non-fixed materials are eliminated. Next, new antibodies with specificity for an antigenic determinant connected to the



**Figure 1** - Illustration of passive cycle ergometer application on lower limbs in critical patients under mechanical ventilation.

plate are added, resulting in the complex Bc-Ag-Ac-enzyme (sandwich technique). A second wash is performed for the removal of unlinked antibodies. Then, a substrate is added that has the property of assuming a different coloration when in contact with the enzyme; this colour is proportional to the amount of mediator present in the sample (antigen). The reading is obtained in a plate reader (Bio-Rad, Tokyo, Japan) at 450 nm and compared to a standard curve obtained with known concentrations of recombinant mediators.

#### Study protocol

The study population was divided into two groups: the control group, consisting of 10 patients who were without any type of therapeutic intervention at the moment when they were submitted to the study protocol, and the intervention group, consisting of 9 patients who were submitted to passive cycle ergometry on their lower limbs with the speed adjusted at 30 cycles per minute for 20 minutes, by a cycle ergometer (Flex Motor with sensor; Cajumoro; Bragança Paulista, Sao Paulo, Brazil). Figure 1 demonstrates the protocol in the lower limbs. The participation in one of the two groups in this study was randomly determined by Microsoft Office Excel 2007.

All results and demographic characteristics were assessed using GraphPad Prism 4 software and Microsoft Office Excel 2007. The presentation of the measured variables was performed through tables and figures. The median and the percentile (25-75%) were used to present continuous variables, whereas categorical data were presented using absolute and relative frequencies.

To test the normality assumption of the variables in the study, the Shapiro-Wilk test was used. The comparative analysis between two groups was performed using the Mann-Whitney test, and the Wilcoxon test was used to compare the same group. Fisher's exact test was used to evaluate the differences between the proportions. The relationship between variables was assessed using the Spearman correlation (non-normal distribution). All findings were considered at a 5% significance level.

#### RESULTS

During the study period, from December 2013 to February 2016, a total of 465 patients with various diseases were admitted to the general ICU, of whom 439 individuals met the exclusion criteria of the study. Only 26 patients were randomized

into two groups; amongst these, only 19 patients finished their analysis, distributed as follows: control group (n=10) and exercise group (n=9) (Figure 2).

Table 1 presents the median and percentile (25 - 75%) of the demographic and clinical variables of each of the two groups: control and cycle ergometer. There were no differences between the two groups regarding age, height, weight, BMI, APACHEII, water balance (BH) in the last 12:00 am, sedation scale of RASS, MV, hospitalization time in ICU, hemoglucostest (HGT), respiratory system compliance (Cst), respiratory system resistance (Rsr), HR, SpO<sub>2</sub>, SBP, diastolic blood pressure (DBP), temperature (T) and ICU mortality, demonstrating the homogeneity between the groups.

Figures 3a and 3b represent the results obtained from the NO analysis of stimulated monocytes (positive controls) and unstimulated (negative control) collected before and after the study protocol from both groups. These figures revealed a reduction in NO variation in the production of stimulated monocytes ( $p=0.0021$ ) and unstimulated ( $p=0.0076$ ) after passive cycle ergometry use compared to the control group.

Table 2 shows the median and percentile (25 - 75%) values for the cytokines, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-10, analysed before and after the study protocol for each group, in which there were no significant changes in cytokines compared to the moments before and after for the two groups.

Correlations were made between cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 and IFN- $\gamma$ ) and NO concentration in the stimulated cells, positive control (C+) and negative control (C-) without any significant difference at  $p > 0.05$ .

#### DISCUSSION

There is no evidence in the literature that describes the effects of a passive cycle ergometer on oxidative stress and immune system parameters in critical patients. However, several other benefits of this intervention have been widely observed, particularly regarding muscle mass loss and improved functionality.

During the period that these patients are restricted to bed, muscle fibre transformation to type II occurs, including reduced oxidative capacity, mitochondrial density and blood capillaries. In addition, the cardiovascular performance is reduced due to lower systolic ejection volume and increased HR. Venous stasis occurs due to reduced activity of the muscle pump in the limbs and an increased risk of developing thrombosis. The period of immobility can also contribute to bone demineralization and sodium and body water reduction (8).

In the present study, the values described in Table 1 show that no differences were found in the demographic and clinical characteristics of the patients in both groups, which demonstrates the homogeneity between groups for all evaluated parameters. These partial results of homogeneity between the groups are important because they do not expose any group to a greater risk factor for its clinical condition commitment. Muscle dysfunction in critical patients is a common clinical condition in patients submitted to prolonged MV periods and hospitalization in intensive care. The magnitude of muscle weakness in the ICU is extremely variable and presents an intimate association with permanence time in bed and exposure to risk factors, such as nutritional condition and MV dependence (4,9).

Critical patients are vulnerable to synthesizing oxidative agents and reducing antioxidants. Oxidative stress increases oxidation and has an important role in the pathophysiological

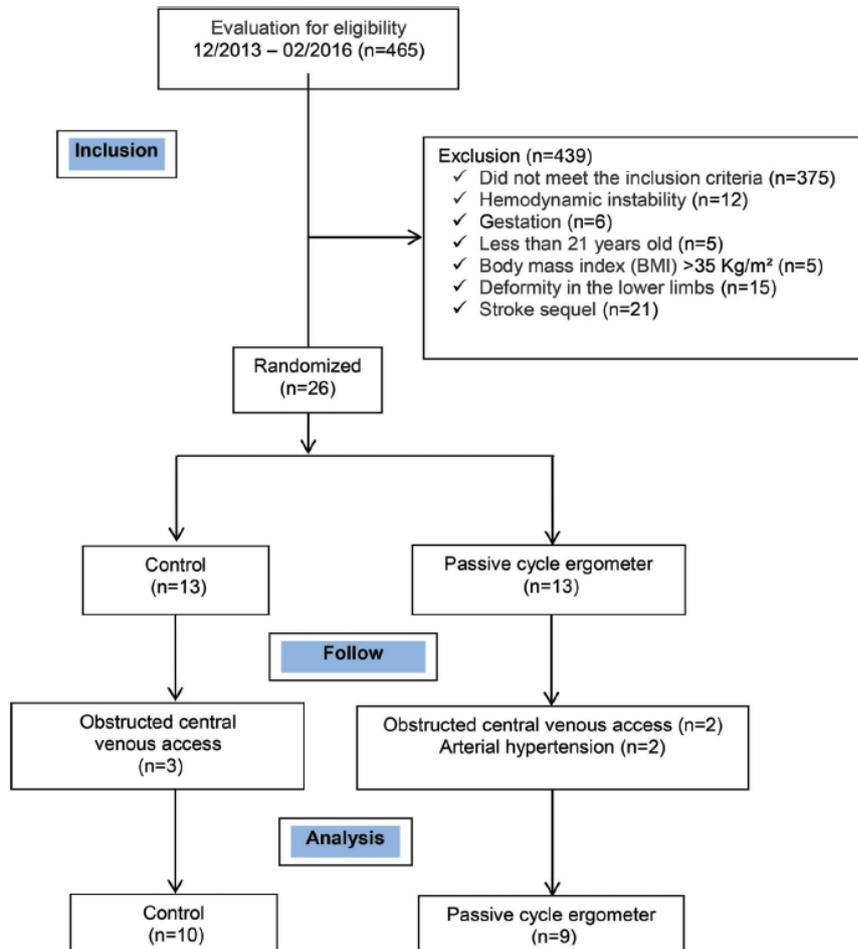


Figure 2 - Flowchart of the patients who participated in the study.

process of muscular dysfunction. Reactive oxygen species (ROS) provide lipid peroxidation, leading to toxin release and arachidonic acid derivatives that damage cell membranes, inactivating the receptor membrane enzymes and ionic chemistry response changes. In myocytes, this process of degradation can be modified by numerous intracellular signals observed in vitro, including the activation of nuclear factor kappa- $\beta$  (NF- $\kappa$   $\beta$ ) (10). Products of cell destruction by ROS produce a positive *feedback*, generating more ROS. Simultaneously, the interaction between ROS with cytokines and other intercellular molecules is associated with muscle degradation.

Figures 3a and 3b show that for both stimulated monocytes (C+) and unstimulated monocytes (C-), there was a reduction in NO values in the cycle ergometer passive group compared to those in the control group. NO values decreased before compared with after the intervention, a phenomenon not observed in the control group.

These findings suggest a potential beneficial effect of passive cycle ergometry in oxidative stress reduction in critical patients; it can be considered a moderate-intensity physical activity for this type of patient, providing a positive change in the redox status of cells and tissues from basal levels,

decreasing oxidative damage and increasing resistance to oxidative stress (11-13). In fact, regular moderate exercise results in adjustments in antioxidant capacity, which protects cells against the damaging effects of oxidative stress, preventing subsequent cell damage (14,15).

Our results correlate with the findings of Mercken et al. (16), who assessed the different intensities of exercise and its effects on oxidative stress, immediately after and 4 hours after the cycle ergometer test with 60% workload, in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). There was a reduction of the induction of systemic oxidative stress triggered by exercise, particularly after submaximal exercises.

Similar to oxidative stress, some selected cytokines also influence muscle degradation and dysfunction in critical patients. In a model to explain cachexia, Reid and Li (17) suggested that the interaction between ROS and proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  are synergistic, perhaps indicative of a pathological positive feedback cycle, which is lower in the regulation of repairing damaged muscle tissue. Thus, it is not only the direct suppression of muscle activity that leads to dysfunction in the presence of TNF- $\alpha$ , but a decrease in repairing and/or an increase of apoptosis that

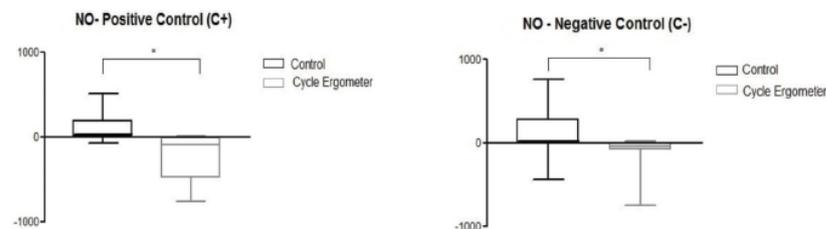
**Table 1** - Comparison of demographic and clinical variables between the two groups.

Demographic and clinical variables	Control (n=10)	Passive cycle ergometer (n=9)	p * value
Age (years)	56.0 (44.0 – 70.5)	77.0 (32.5 – 81.0)	0.35
Height (cm)	164.5 (157.5 -172.0)	160.0 (153.5 – 162.5)	0.09
Weight (Kg)	67.5 (60.0 -80.0)	70.0 (55.0 – 80.0)	0.84
BMI (Kg/cm <sup>2</sup> )	25.1 (23.9 – 26.1)	27.3 (22.1 – 33.1)	0.40
APACHE II	23.0 (19.0 – 27.0)	25.0 (15.5 -29.5)	0.90
WB-12:00 am (ml)	1131.0 (200.5 – 1811.0)	487.0 (343.0 – 1341.0)	0.60
MV T (days)	4.0 (2.5 – 8.0)	5.0 (4.0 – 8.0)	0.11
ICU T (days)	4.0 (2.5 – 8.0)	6.0 (5.0 -8.0)	0.06
HGT	130.5 (92.5 – 176.5)	122.0 (88.0 – 177.5)	0.06
Cst (ml/cm H <sub>2</sub> O)	32.2 (27.1 – 37.1)	27.0 (17.6 – 33.9)	0.15
Rsr (cm H <sub>2</sub> O/L/s)	12.0 (9.2 – 18.0)	10.0 (10.0 – 16.0)	0.66
FC (bpm)	83.0 (61.0 – 99.0)	86.0 (78.5 – 94.5)	0.60
SpO <sub>2</sub> (%)	98.5 (94.0 – 99.5)	98.0 (97.5 – 99.0)	0.71
SBP (mm Hg)	137.5 (108.5 – 162.5)	142.0 (125.0 – 151.0)	0.71
DBP (mm Hg)	80.0 (62.0 – 93.0)	74.0 (66.0 – 88.5)	0.84
Temperature (°C)	36.0 (36.0 - 36.5)	36.5 (36.5 – 37.0)	0.21
ICU mortality	6 (60.0)	7 (77.7)	0.63
Primary reason for admission			
Respiratory problem	4 (40.0)	4 (44.4)	
Cardiac problem	2 (20.0)	2 (22.2)	–
Sepsis/infection	1 (10.0)	2 (22.2)	
Other	3 (30.0)	1 (11.1)	
Comorbid conditions			
Respiratory	2 (20.0)	1 (11.1)	
Cardiac	2 (20.0)	3 (33.3)	
Endocrine	2 (20.0)	1 (11.1)	–
Urinary	1 (10.0)	1 (11.1)	
Chronic renal failure	3 (30.0)	2 (22.2)	
Sepsis/infection	1 (10.0)	1 (11.1)	

Data are the median (25 -75% percentile) before testing.

\* Mann-Whitney test and Fisher's exact test.

Body mass index (BMI); Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE II); water balance in the last 24 hours (WB-24 h); mechanical ventilation time (MV T); intensive care unit time (ICU T); hemoglucoest (HGT); static compliance of the respiratory system (Cst); resistance of the respiratory system (Rsr); heart rate (HR); peripheral oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>); systolic blood pressure (SBP); diastolic blood pressure (DBP); temperature and intensive care unit (ICU) mortality.



**Figure 3a and 3b** - Variation in the nitric oxide (NO) values in stimulated control positive cell (C +) and unstimulated in the two groups studied: control and passive cycle ergometer. \* Mann-Whitney Test. Differences between the control group and cycle ergometer 3a. (\* $p=0.0021$ ) and 3b. (\* $p=0.0076$ ).

results in muscle weakening of these mediated inflammatory cytokines.

Table 2 shows that there was no significant difference between the values of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-10 compared to the moments before and after the cycle ergometer intervention. Comparing the cycle ergometer and control groups demonstrated that the passive cycle ergometer in this study was not enough to promote changes in the immune system after 1 hour of passive exercise. The level of exercise intensity and the kinetics of cytokines may have been responsible for the lack of changes in serum levels of these cytokines in the studied groups.

According to Winkelman et al. (18), in healthy individuals, increased TNF- $\alpha$  varies in response to exercise; it is greater

when oxidative stress is present during the exercise. Serum levels of TNF- $\alpha$  also reduce antioxidant levels in some skeletal muscles. Because TNF- $\alpha$  is a proinflammatory cytokine, it stimulates the synthesis of several factors, including adhesion molecules, and ROS.

Another very important cytokine in the inflammatory process is IL-6, which has a wide range of biological activities. It is synthesized by the immune system and skeletal muscle cells, adipocytes, endothelial cells and intestinal epithelium cells (19). Similar to TNF- $\alpha$ , IL-6 is released early in the inflammatory cascade. Unlike TNF- $\alpha$ , IL-6 increases in myosin and appears to have a role in the maintenance of the power supply during the lifetime of the myocyte.





- AACN Clin Issues. 2002;13(2):263-76, <http://dx.doi.org/10.1097/00044067-200205000-00011>.
4. De Jonghe B, Shirshir T, Lefaucheur JP, Authier FJ, Durand-Zaleski I, Boussarcar M, et al. Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study. *JAMA*. 2002;288(22):2859-67, <http://dx.doi.org/10.1001/jama.288.22.2859>.
  5. Mador MJ, Bozkanat E. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2001;2(4):216-24, <http://dx.doi.org/10.1186/rr60>.
  6. Duscha BD, Annex BH, Green HJ, Pippen AM, Kraus WE. Deconditioning fails to explain peripheral skeletal muscle alterations in men with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(7):1170-4, [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)01740-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(02)01740-0).
  7. Bax L, Staes F, Verhagen A. Does neuromuscular electrical stimulation strengthen the quadriceps femoris? A systematic review of randomised controlled trials. *Sports Med*. 2005;35(3):191-212, <http://dx.doi.org/10.2165/00007256-200535030-00002>.
  8. Nava S, Piaggi G, De Mattia E, Carlucci A. Muscle retraining in the ICU patients. *Minerva Anesthesiol*. 2002;68(5):341-5.
  9. Latronico N, Rasulo FA. Presentation and management of ICU myopathy and neuropathy. *Curr Opin Crit Care*. 2010;16(2):123-7, <http://dx.doi.org/10.1097/MCC.0b013e328336a229>.
  10. Li YP, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR, Reid MB. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB J*. 1998;12(10):871-80.
  11. Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H, Fehrenbach E. Free radicals and oxidative stress in exercise—immunological aspects. *Exerc Immunol Rev*. 1999;5:22-56.
  12. Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercised-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept*. 2001;10(1-2):125-40, <http://dx.doi.org/10.1159/000046880>.
  13. Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(2):280-5, <http://dx.doi.org/10.1042/bst0300280>.
  14. Dekkers JC, Van Doornen LJ, Kemper HC. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med*. 1996;21(3):213-38, <http://dx.doi.org/10.2165/00007256-199621030-00005>.
  15. Aguilo A, Tauler P, Pilar Guix M, Villa G, Córdova A, Tur JA, et al. Effect of exercise intensity and training on antioxidants and cholesterol profile in cyclists. *J Nutr Biochem*. 2003;14(6):319-25, [http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863\(03\)00052-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863(03)00052-4).
  16. Mercken EM, Hageman GJ, Schols AM, Akkermans MA, Bast A, Wouters EF. Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(8):994-1001, <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200411-1580OC>.
  17. Reid MB, Li YP. Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res*. 2001;2(5):269-72, <http://dx.doi.org/10.1186/rr67>.
  18. Winkelman C. Inactivity and inflammation in the critically ill patient. *Crit Care Clin*. 2007;23(1):21-34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2006.11.002>.
  19. Fink MP. The prevention and treatment of sepsis: is interleukin-6 a drug target or a drug? *Crit Care Med*. 2006;34(3):919-21, <http://dx.doi.org/10.1097/01.CCM.0000203108.60429.DE>.
  20. Nemet D, Hong S, Mills PJ, Ziegler MG, Hill M, Cooper DM. Systemic vs. local cytokine and leukocyte responses to unilateral wrist flexion exercises. *J Appl Physiol*. 2002;93(2):546-54, <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00035.2002>.
  21. Karavidas AI, Raisakis KG, Parissis JT, Tsekoura DK, Adamopoulos S, Korres DA, et al. Functional electrical stimulation improves endothelial function and reduces peripheral immune responses in patients with chronic heart failure. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2006;13(4):592-7, <http://dx.doi.org/10.1097/01.hjr.0000219111.02544.ff>.
  22. Akar O, Gunay E, Ulasli SS, Ulasli AM, Kacar E, Sariaydin M, et al. Efficacy of Neuromuscular Electrical Stimulation in Patients with COPD Followed in Intensive Care Unit. *Clin Respir J*. 2015.