



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

**LUANA CARNEIRO RIBEIRO**

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

**RECIFE**  
**2017**

**LUANA CARNEIRO RIBEIRO**

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro**

Diretora de Pós-Graduação da Propesq da UFPE

Departamento de Medicina Tropical- UFPE

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

**RECIFE**

**2017**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Ribeiro, Luana Carneiro

Efeito da estimulação elétrica neuromuscular sobre o estresse oxidativo e citocinas inflamatórias em pacientes críticos/ Luana Carneiro Ribeiro. – Recife: O Autor, 2017.

65 f.: il.

Orientadora: Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Dissertação(mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Estimulação elétrica transcutânea do nervo 2. Músculos – Doenças 3. Unidade de tratamento intensivo I. Castro, Célia Maria Machado Barbosa(orient.) II. Título.

616.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-142

**LUANA CARNEIRO RIBEIRO**

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada a Saúde.

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2017

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profª. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Prof. Dra. Angélica da Silva Tenório/UFPE  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Profª. Dr. Valdecir Castor Galindo Filho  
Universidade Católica de Pernambuco(UNICAP)

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a DEUS por sempre iluminar meu caminho, minhas escolhas e por me fortalecer para seguir em frente, independente dos obstáculos.

A meus pais, que sempre priorizaram o investimento na minha educação, e para isso tiveram que abdicar de muitas coisas durante a vida. Hoje, estou colhendo os frutos e me sinto feliz e muito agradecida por tudo que eles fizeram por mim e por saber que eles estão orgulhosos com minhas conquistas.

Ao meu tio Jáder Júnior, que sempre foi minha maior inspiração e exemplo, e que embora hoje não esteja mais aqui conosco, tenho certeza que de onde estiver sempre vai olhar por mim e torcer pelas minhas conquistas.

Ao meu noivo, Pablo Interaminense, que sempre esteve presente e disposto a me ajudar, e principalmente pela compreensão nos momentos mais difíceis, e pelo companherismo.

À minha orientadora, Célia Castro, pela confiança e oportunidade de poder aprender mais sobre essa área fascinante da Imunologia, e por toda ajuda e disponibilidade oferecidas durante esses dois anos.

À Eduardo Ériko, doutorando do Lika, que foi fundamental para realização dessa pesquisa e me concedeu a oportunidade de trabalharmos juntos. Sem dúvidas, o trabalho não teria sido concluído com êxito se não fosse pela sua dedicação.

Aos professores do programa de mestrado de Biologia Aplicada à saúde do Lika, que durante esses dois anos me fizeram crescer com seus ensinamentos em todas as disciplinas ofertadas.

Aos meus colegas de turma do mestrado, que compartilharam tanto momentos bons, quanto momentos mais difíceis e que fizeram com que esses dois anos passassem de forma mais amena.

Aos profissionais do Hospital Agamenom Magalhães que não mediram esforços para colaborar e tornar o desenvolvimento dessa pesquisa possível. O trabalho de cada um da equipe foi fundamental para o sucesso e conclusão deste trabalho.

Aos residentes de Fisioterapia do Hospital Agamenom Magalhães, que estavam sempre disponíveis para ajudar, e que possibilitaram que as coletas fossem realizadas com maior agilidade, mesmo com todas as dificuldades.

Aos alunos de iniciação científica, Bárbara, Marthley e Joana, que foram essenciais no período das coletas no laboratório de Imunologia do Lika e que dispuseram de grande parte do seu tempo para ajudar.

Muito Obrigada!

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”

Leonardo da Vinci

## RESUMO

A restrição ao leito em pacientes críticos que necessitam de ventilação mecânica (VM) por período prolongado proporciona inúmeros prejuízos ao sistema osteomioarticular. Esse descondicionamento físico provocado pelo repouso prolongado, associado ao estresse oxidativo e citocinas inflamatórias inerentes a doença crítica, acelera o desenvolvimento da fraqueza muscular adquirida na unidade de terapia intensiva (UTI). A estimulação elétrica neuromuscular (EENM) surge como um recurso que tem como objetivo prevenir a hipotrofia e melhorar a funcionalidade, favorecendo a redução do tempo de internamento na UTI. No entanto, ainda são desconhecidos seus efeitos sobre o estresse oxidativo e citocinas inflamatórias nessa população. Este estudo teve como objetivo analisar o impacto da EENM sobre o estresse oxidativo e citocinas inflamatórias em pacientes críticos. Trata-se de um ensaio clínico, controlado e randomizado, composto por uma amostra de 19 pacientes internados na UTI do Hospital Agamenon Magalhães sob VM. Os pacientes foram alocados em 2 grupos: grupo EENM (n=09) – realizaram a EENM no ventre muscular do quadríceps de ambos os membros durante 20min e grupo controle (n=10) - não realizaram nenhum tipo de intervenção terapêutica no momento da coleta. Foram avaliados os níveis de óxido nítrico (ON) e de algumas citocinas inflamatórias específicas (TNF- $\alpha$ , IFN -  $\gamma$ , IL-6 e IL-10) antes e depois de uma hora do protocolo do estudo. Os principais resultados apontam que em relação às variáveis demográficas e clínicas, os grupos mostraram-se homogêneos, o que tornou possível a comparação entre eles. Quanto à produção do ON, percebemos uma redução significativa quando comparadas as análises antes e depois da célula estimulada (p= 0,018) e não estimulada (p=0,025) no grupo EENM. Ainda em relação ao ON, comparando os dois grupos, observamos uma redução significativa no grupo EENM quando comparado ao controle (p=0.003). Já com relação às citocinas inflamatórias avaliadas não observamos alterações significativas entre os grupos. Podemos concluir que a EENM aplicada a pacientes críticos em VM, foi suficiente para provocar redução na concentração de ON em apenas um sessão, sugerindo um efeito positivo deste recurso sobre o estresse oxidativo. Com relação às citocinas inflamatórias não foram encontrados efeitos após realização da EENM.

**Palavras-chave:** Oxido nítrico. Citocinas. Estimulação elétrica nervosa transcutânea. Unidade de terapia intensiva.



## ABSTRACT

Bed restriction in critically ill patients requiring long-term mechanical ventilation (MV) leads to many impairments in the osteomioarticular system. This physical deconditioning caused by prolonged rest, associated with oxidative stress and inflammatory cytokines inherent to critical illness, accelerates the development of muscle weakness acquired in the intensive care unit (ICU). Neuromuscular electrical stimulation (NMES) emerges as a resource that aims to prevent hypotrophy and improve functionality, favoring the reduction of the length of stay in the ICU, however, its effects on oxidative stress and inflammatory cytokines are still unknown. This study aimed to analyze the impact of NMES on oxidative stress and inflammatory cytokines in critically ill patients. This is a randomized controlled clinical trial consisting of a sample of 19 patients admitted to the ICU at Agamenon Magalhães Hospital under MV. Patients were allocated in 2 groups: NMES group (n = 09) - performed NMES in the quadriceps muscle belly of both limbs for 20 min and control group (n = 10) - did not perform any type of therapeutic intervention at the time of the study protocol. Levels of nitric oxide (NO) and some specific inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-10) were evaluated before and after one hour of the study protocol. The results show that in relation to the demographic and clinical variables, the groups were homogeneous, which made possible the comparison. Regarding NO production, we noticed a significative reduction when compared to analyzes before and after the stimulated cell (p = 0.018) and non-stimulated cell (p = 0.025) in the NMES group. Still in relation to NO, comparing the two groups, we observed a significant reduction in the NMES group compared to the control group (p = 0.003). Regarding the inflammatory cytokines evaluated, we did not observe significant changes. We can conclude that NMES applied to critically ill patients on MV was sufficient to cause a reduction in NO concentration in only one session, suggesting a positive effect on oxidative stress. Regarding the parameters of the immune system, its application was not able to cause significant changes.

**Key-words:** Nitric oxide. Cytokines. Transcutaneous electrical nerve stimulation. Intensive care unit.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> : Imagem do volume muscular do quadríceps através de TC por scan no 1º dia de internamento e após uma semana de imobilismo em pacientes com choque séptico.....	19
<b>Figura 2:</b> Fatores de risco envolvidos na perda de massa muscular e na fraqueza adquirida na UTI.....	21
<b>Figura 3:</b> Resume o local (músculo) e interação sistêmica de citocinas.....	23
<b>Figura 4A e 4B:</b> Decurso no tempo de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias na circulação sistêmica durante a doença crítica.....	24
<b>Figura 5:</b> Fluxograma de captação dos pacientes . . . . .	29
<b>Figura 6:</b> Ilustração da aplicação da estimulação elétrica muscular (EENM) no quadríceps em pacientes críticos. (quadríceps – reto femoral e vasto lateral).....	33
<b>Figura 7a e 7b:</b> Diferença da produção do ON nos monócitos C+ e C- no grupo eletroestimulado e no grupo controle.....	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Descrição dos movimentos e graus de força avaliados pelo escore Medical Research Council (MRC) .....	21
<b>Tabela 2:</b> Variáveis demográficas e clínicas, causas da admissão e comorbidades entre o grupo eletroestimulado e o grupo controle.....	36
<b>Tabela 3:</b> Produção do ON cultivado no monóxido, no C+ e C- avaliados nos instantes antes e depois no grupo eletroestimulado e no grupo controle. ....	37
<b>Tabela 4:</b> Valores das citocinas; TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6 e IL- 10, avaliados nos instantes antes e depois no grupo eletroestimulado e no grupo controle.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VM	- Ventilação mecânica
UTI	- Unidade de terapia intensiva
DPOC	- Doença pulmonar obstrutiva crônica
ERO	- Espécie reativa de oxigênio
ERN	- Espécie reativa de nitrogênio
ON	- Óxido nítrico
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
IL-1	- Interleucina 1
IL-1 $\beta$	- Interleucina 1 beta
IL-6	- Interleucina 6
IL-10	- Interleucina 10
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral - alfa
EENM	- Estimulação elétrica neuromuscular
BNM	- Bloqueador neuromuscular
MRC	- Medical Research Council
FC	- Frequência cardíaca
FES	- Functional electrical stimulation
IMC	- Índice de massa corpórea
HAM	- Hospital Agamenon Magalhães
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
PAS	- Pressão arterial sistólica
SpO <sub>2</sub>	- Saturação periférica de oxigênio
FiO <sub>2</sub>	- Fração inspirada de oxigênio
FR	- Frequência respiratória
Hb	- Hemoglobina
T	- Temperatura
APACHE II	- Acute Physiology and Chronic Health Disease II
EDTA	- Ethylenediamine tetraacetic acid
LIKA	- Laboratório de Imunologia Keizo Azami
UFPE	- Universidade Federal de Pernambuco
PBMC	- Peripheral blood mononuclear cell
LPS	- Lipopolissacarídeo

BH	- Balanço hídrico
PAD	- Pressão arterial diastólica
C+	- Controle positivo
C-	- Controle negativo
SPSS	- Statistical Package for the Social Sciences

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 HIPÓTESE .....	16
1.2 OBJETIVOS.....	16
1.2.1 Objetivo geral.....	16
1.2.2 Objetivos específicos .....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1 IMOBILISMO: ALTERAÇÕES MUSCULARES E SISTÊMICAS .....	18
2.2 FRAQUEZA MUSCULAR ADQUIRIDA NA UTI .....	19
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA DOENÇA CRÍTICA .....	22
2.4 MOBILIZAÇÃO PRECOCE NO PACIENTE CRÍTICO .....	25
2.4.1 Estimulação Elétrica Neuromuscular .....	26
<b>3 MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
3.1 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO .....	28
3.2 DESENHO E POPULAÇÃO DO ESTUDO .....	28
3.3 TAMANHO DA AMOSTRA.....	29
3.4 MÉTODOS E TÉCNICAS DE INVESTIGAÇÃO.....	30
3.4.1 Critérios de inclusão .....	30
3.4.2 Critérios de exclusão .....	30
3.4.3 Critérios de descontinuação .....	30
3.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS .....	30
3.6 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO .....	31
3.6.1 Estresse oxidativo.....	31
3.6.2 Citocinas Inflamatórias.....	32
3.7 PROTOCOLO DO ESTUDO.....	33
3.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	34
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>
<b>APÊNDICES E ANEXOS</b> .....	<b>50</b>
<b>APÊNDICE A: FICHA DE AVALIAÇÃO (COLETA DE DADOS)</b> .....	<b>51</b>

<b>APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>52</b>
<b>APÊNDICE C: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO A – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A restrição ao leito em pacientes críticos que necessitam de ventilação mecânica (VM) por período prolongado proporciona inúmeros prejuízos ao sistema osteomioarticular (GRUTHER et al, 2008). O descondicionamento físico provocado pelo repouso prolongado no leito, associado à sepse e ao uso de medicações como corticosteróides e bloqueadores neuromusculares, levam ao desenvolvimento da fraqueza muscular adquirida na unidade de terapia intensiva (UTI) (CHIANG et al., 2006; DE JONGHE et al., 2007). Essa condição é uma das complicações mais frequentes da permanência na UTI podendo sua incidência alcançar de 30 a 60% (GEORGIOS et al., 2013).

A fraqueza muscular adquirida na UTI está associada a uma maior recorrência de infecções respiratórias, maior tempo de VM e de internamento hospitalar, maior mortalidade, além de contribuir para uma pior condição funcional e prejuízos na qualidade de vida após a alta (POULSEN et al, 2009; ENGEL et al, 2013). Estudos recentes mostram que mais de 50% dos pacientes internados em UTI são incapazes de retornar aos níveis de atividade pré internamento (DE JONGHE et al. 2007).

Entre as principais complicações apresentadas pelos pacientes críticos que desenvolvem esta condição clínica podemos citar: contraturas musculares; perda funcional global; redução do consumo máximo de oxigênio; trombose venosa profunda; úlceras por pressão; pneumonia; atelectasia; desmineralização óssea e alterações do estado emocional, como ansiedade, apatia, depressão e labilidade emocional (DE JONGHE et al., 2002).

Os prejuízos na função muscular variam de uma diminuição de força de 1,3 a 3% por dia, podendo chegar até 10% da força total na primeira semana de imobilidade (TOPP et al., 2002). As alterações estruturais das fibras musculares aparecem 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).

Várias pesquisas demonstram que a sepse, patologia desenvolvida com bastante freqüência nos pacientes críticos, associada a um longo período de imobilização, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da fraqueza muscular adquirida na UTI (DE JONGHE et al., 2002; NAVA et al., 2002). Entretanto, o mecanismo responsável pelo decaimento muscular decorrente desses fatores, ainda não foi completamente esclarecido. Sabe-se que duas interações moleculares estão envolvidas, o estresse oxidativo e as citocinas proinflamatórias. Dessa forma, acredita-se que este sinergismo entre estresse oxidativo,



citocinas pró-inflamatórias e imobilidade, cause ou acelere a atrofia muscular (DUSCHA et al., 2002).

O estresse oxidativo através das espécies reativas de oxigênio (ERO) íon superóxido e radicais hidrolisados e das espécies reativas de nitrogênio (ERN) - óxido nítrico, nitritos e nitratos são capazes de causar dano oxidativo no DNA, nos lipídeos e proteínas, sendo assim um dos responsáveis pela disfunção e degradação muscular (BARREIROS et al, 2006). As espécies reativas provocam a liberação de toxinas e derivados do ácido araquidônico, que levam a alteração na membrana celular dos miócitos. Esses elementos interagem com citocinas e outras moléculas intercelulares intensificando a degradação muscular. Como os pacientes críticos são mais vulneráveis para síntese de agentes oxidantes e apresentam deficiência de agentes antioxidantes, o declínio muscular nessa população se torna ainda mais exacerbado (WINKELMAN, 2007).

Assim como o estresse oxidativo, algumas citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), e o fator de necrose tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ ) também influenciam na disfunção e degradação muscular em pacientes críticos (FINK et al., 2006). Em um modelo para explicar a caquexia, Reid et al (2011), sugeriram que há interação entre a ERO e as citocinas pró-inflamatórias. Através dessa interação, ocorre redução no processo de reparação do tecido muscular danificado. Assim, não é simplesmente a supressão direta da atividade muscular que leva à disfunção muscular, mas um decréscimo da reparação e/ou incremento da apoptose que resultam no enfraquecimento muscular mediados por estas citocinas pró-inflamatórias (REID, 2011).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, inicialmente identificada pela sua capacidade para desligar a produção de citocinas pelas células T. Estudos têm demonstrado que a IL-10 inibe a síntese de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , intermediários reativos de oxigênio, e outros fatores pró-inflamatórios. Depois do exercício, altos níveis circulantes de IL-6 são seguidos por aumento da produção de IL-10. Estudos sugerem que o exercício proporciona uma ação anti-inflamatória através da indução de IL-10 e IL-6 e inibição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Dessa forma, o exercício físico é explorado como um agente regulador da inflamação e da função muscular (NEMET et al., 2002; WINKELMAN, 2007).

Os benefícios do exercício na cascata inflamatória fez com que diversas pesquisas fossem desenvolvidas com o objetivo de utilizar protocolos de mobilização precoce como alternativa terapêutica para prevenir os efeitos deletérios da fraqueza muscular adquirida na UTI ou minimizá-la (ENGEL et al, 2013).

A mobilização precoce é uma estratégia segura e viável que promove melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes críticos (LORD et al., 2013). Dentre os procedimentos preconizados, destaca-se a aplicação da estimulação elétrica neuromuscular (EENM), recurso que proporciona contração muscular sem que haja aumento do trabalho cardiovascular, podendo dessa forma, ser utilizado em pacientes com insuficiência respiratória grave. Enquadram-se nesta situação os pacientes críticos que, sobretudo, na fase aguda da doença, permanecem sedados e não podem colaborar com a realização de exercícios. O objetivo da EENM é melhorar a função das propriedades musculares, o fluxo sanguíneo intramuscular, a produção de força máxima e *endurance*, prevenindo assim a atrofia muscular, e promovendo uma melhor recuperação funcional (BAX et al, 2005; MORRIS et al., 2008).

Os estudos que avaliam os efeitos da EENM em pacientes críticos têm se expandido rapidamente nos últimos anos, principalmente porque vários benefícios como, a prevenção do hipotrofismo, melhora da força muscular, redução do tempo de internamento na UTI e melhora funcional já estão bem estabelecidos. No entanto, não há na literatura estudos que demonstrem o efeito agudo da EENM sobre o estresse oxidativo e citocinas inflamatórias em pacientes críticos.

## 1.1 HIPÓTESE

A EENM é um recurso bastante utilizado nos protocolos de mobilização precoce em pacientes críticos e apresenta vários benefícios sobre a atenuação da perda de massa muscular e melhora funcional. Dessa forma, acredita-se que seus efeitos possam contribuir para minimizar os prejuízos causados pelo imobilismo e pela doença crítica, através da redução do estresse oxidativo e dos níveis de citocinas proinflamatórias.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Analisar o efeito agudo da EENM de quadríceps sobre o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias em pacientes críticos.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar a análise do estresse oxidativo, através da contagem do ON celular, antes e após a realização da EENM em pacientes críticos;
- Analisar as alterações dos parâmetros da resposta imune, através da quantificação do TNF- $\alpha$ , das interleucinas 6 e 10, e do IFN-  $\gamma$  do sangue periférico antes e após a realização da EENM em pacientes críticos.

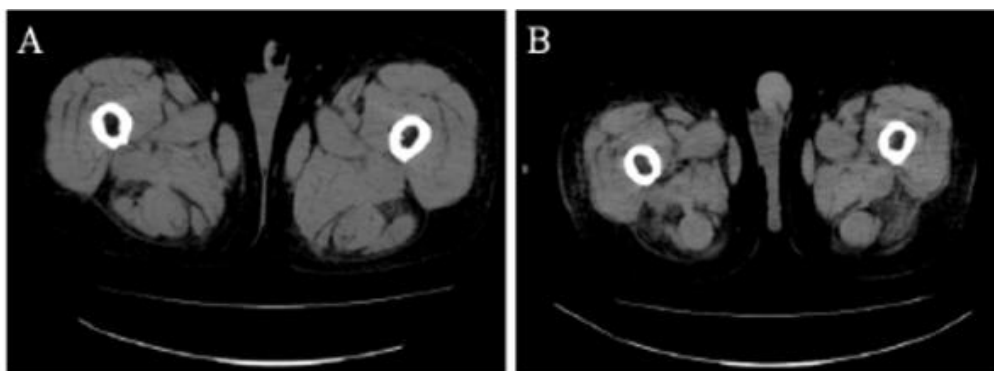
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 IMOBILISMO: ALTERAÇÕES MUSCULARES E SISTÊMICAS

O imobilismo caracteriza-se pela permanência no leito por períodos prolongados, sendo assim, um fator determinante no desenvolvimento de disfunções em múltiplos órgãos e sistemas. Esta realidade é bastante freqüente em pacientes internados em UTIs, já que devido a sua condição clínica de maior gravidade e instabilidade, eles necessitam frequentemente passar um longo período no leito sob uso de medicações, como drogas sedativas e analgésicas (LEES et al., 2005). Além disso, mais de 50% dos pacientes críticos necessitam do auxílio da VM para reversão da insuficiência respiratória grave, colaborando para o aumento do tempo de restrição ao leito (TOPP et al., 2002).

No sistema musculoesquelético, o imobilismo provoca alteração na conformação das fibras musculares, fazendo com que nos músculos onde ocorre predominância das fibras de contração lenta (tipo I), exista a diferenciação para fibras de contração rápida (tipo II). Da mesma forma, as fibras do tipo II, também sofrem alterações na sua espessura pela falta de ativação, o que progressivamente pode levar à necrose tecidual e substituição de tecido muscular por tecido adiposo e fibrose. Todas essas alterações acontecem, pois 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, além do aporte vascular (BIERBRAUER et al., 2012; GRUTHER et al., 2008).

Vários estudos já avaliaram a disfunção muscular através de exames de imagem após o imobilismo em pessoas saudáveis e em pacientes críticos. TOPP et al.(2002), avaliaram indivíduos saudáveis após uma semana de imobilismo e observaram redução de 10% da força muscular total. Já POLSEN et al (2010), avaliaram o volume muscular do quadríceps de pacientes críticos com choque séptico através da tomografia computadorizada (TC) por scan após uma semana de imobilismo e observaram que após uma semana de imobilismo no leito, houve redução significativa do volume muscular (Figura 1). Outros autores avaliaram a espessura e qualidade do quadríceps através de ultrassonografia a beira do leito e realizaram avaliação funcional após a alta hospitalar, mostrando que nos primeiros 10 dias de internamento houve maior perda na espessura e qualidade do músculo e que isto foi suficiente 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*) após a alta (PARRY et al., 2015).



**Figura 1:** Imagem do volume muscular do quadríceps através de TC por scan após uma semana de imobilismo em pacientes com choque séptico. Nota-se que houve redução significativa do volume muscular após 1 semana ( imagem B) quando comparado ao primeiro dia ( imagem A)

**Fonte:** (POLSEN et al, 2010)

As conseqüências do imobilismo vão muito além da disfunção muscular, levando a modificações nos diversos sistemas orgânicos. As alterações no sistema cardiovascular incluem diminuição de volume sanguíneo plasmático, com redução do volume de ejeção sistólico e aumento da frequência cardíaca (FC) (LEES et al, 2005). Além disso, envolvendo o sistema respiratório, ocorre perda de volumes e capacidades pulmonares decorrentes da redução do decúbito, de eventuais atelectasias e possíveis pneumonias associadas à ventilação mecânica. Somam-se também outros fatores como, o aumento da excreção de cálcio e o desbalanço dos eletrólitos, com redução da massa óssea, bem como a diminuição na nutrição articular, o que resulta em contraturas e posturas viciosas, podendo se tornar permanentes. Por fim, do ponto de vista neurológico, o paciente pode desenvolver *delirium* e desorientação, fatores cruciais que aumentam a dependência e servem de obstáculo para o desenvolvimento da funcionalidade (WINKELMAN, 2007).

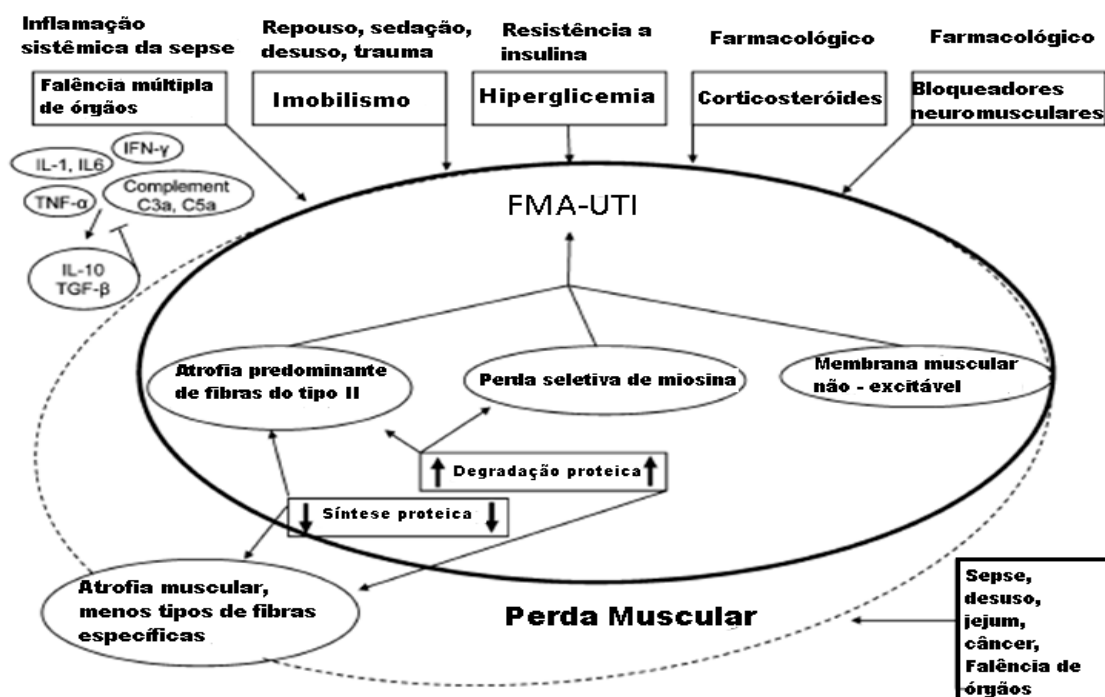
## 2.2 FRAQUEZA MUSCULAR ADQUIRIDA NA UTI

A fraqueza muscular adquirida na UTI é um dos grandes desafios encontrados atualmente pelos profissionais que trabalham nesta área. Apesar dos avanços tecnológicos e da maior sobrevivência dos pacientes críticos, a incidência desta condição clínica ainda alcança de 30% a 60%, o que a transforma em um ponto chave no prognóstico desses pacientes. (GEORGIOS et al., 2013; ; KRAYCHETE et al., 2006). Caracteriza-se por fraqueza muscular generalizada, perda acentuada de massa muscular, diminuição ou até mesmo abolição dos

reflexos profundos e alterações de sensibilidade. Entretanto, para um diagnóstico correto é necessário que a doença crítica tenha precedido o desenvolvimento da fraqueza muscular e que sejam afastadas outras doenças neuromusculares, como a síndrome de Guillain-Barre (LATRONICO et al., 2011).

A etiologia da fraqueza muscular adquirida na UTI é multifatorial, tendo como principais fatores desencadeantes a sepse, o imobilismo, o uso de corticóides, sedativos e bloqueadores neuromusculares, desnutrição, hiperglicemia e tempo de VM prolongada (GODOY et al., 2015). Todos esses fatores, dos quais o paciente crítico está exposto na UTI, podem acarretar, em atrofia e perda de força muscular. Além disso, pode ser detectada a diminuição da excitabilidade elétrica muscular, significativa perda de miosina, desorganização dos sarcômeros, prejuízo na autofagia e no volume proteico. Essas alterações se devem a um desequilíbrio no metabolismo proteico, com um predomínio da proteólise em detrimento a síntese de proteínas (Figura 2) (SCHEFOLD et al., 2010; FRIEDRICH et al., 2015).

A sepse grave, fator etiológico importante, acarreta a ativação do sistema imunológico, através da liberação de citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e interleucinas proinflamatórias (IL -6 e IL-1) e também o aumento do estresse oxidativo, com liberação de ERO. Os sinais clínicos da infecção irão desencadear a longo prazo, como medida de proteção, a liberação de mediadores antiinflamatórios (IL-10 e TNF- $\beta$ ). Percebe-se então, que os pacientes críticos além de estarem expostos aos efeitos do imobilismo, também apresentam aumento do estresse oxidativo e da liberação de citocinas inflamatórias pela condição clínica, o que potencializa a chance de desenvolvimento da fraqueza muscular adquirida na UTI (SCHEFOLD et al., 2010).



**Figura 1:** Fatores de riscos envolvidos na perda de massa muscular e na fraqueza adquirida na UTI.  
**Fonte:** Modificada de (SCHEFOLD et al., 2010).

A avaliação da fraqueza muscular adquirida na UTI pode ser realizada à beira do leito de forma simples e prática. O Medical Research Council (MRC) é um *score* que consiste na avaliação da força muscular periférica através da realização de seis movimentos bilaterais, com graduação de força de 0 a 5 (Tabela 1). Este *score* é bastante reprodutível em pacientes colaborativos e para indicar fraqueza, os valores devem ser abaixo de 48 (ALI et al., 2008). Além disso, De Jongue et al. (2007), mostraram que o *score* de MRC < 48 está relacionado também ao aumento do tempo de desmame da VM, de dias de internamento na UTI e hospitalar (JONGUE et al, 2007).

**Tabela 1:** Descrição dos movimentos e graus de força avaliados pelo *score* Medical Research Council (MRC).

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

**Fonte:** (BITTNER et al., 2009).

Outro teste de fácil aplicação que pode ser utilizado à beira do leito na avaliação da fraqueza é o teste de preensão palmar através do dinamômetro, entendido como indicador geral de força e potência musculares. Neste teste, valores abaixo de 7Kg/força para mulheres e 11 Kg/força para homens são indicativos de fraqueza (ALI et al., 2008).

Tanto o *escore* de MRC como o teste de preensão 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 encontram-se não colaborativos ou sem adequado nível de consciência. Diante dessas limitações, 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).

### 2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA DOENÇA CRÍTICA

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 muscular seja acelerada ou agravada pela sinergia entre estresse oxidativo, citocinas e imobilidade (SCHEFOLD et al., 2010; WINKELMAN, 2007).

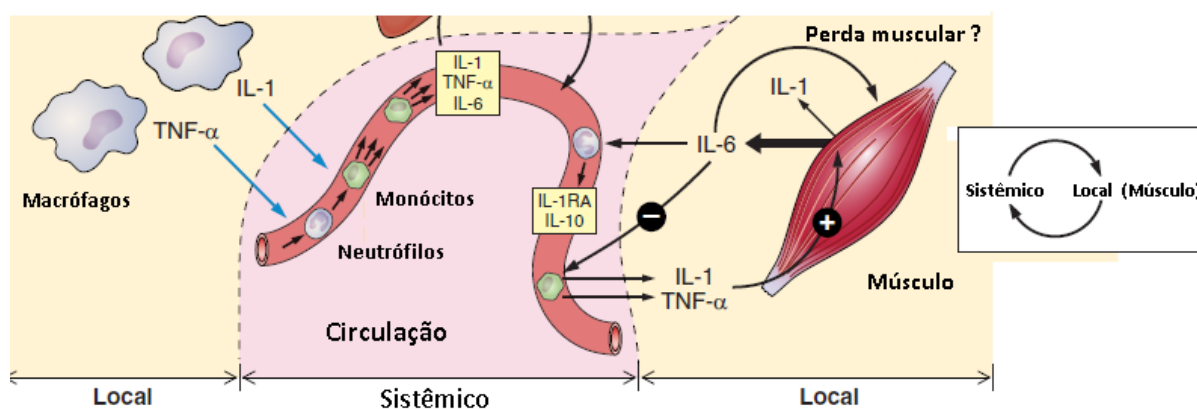
Diante de uma infecção grave, o paciente crítico tende a criar respostas na tentativa de acelerar as reações enzimáticas defensivas, reduzir a replicação de patógenos, aumentar a proliferação de células imune e conservar energia. Isto irá ocorrer com o reconhecimento de receptores e pela liberação das citocinas e radicais livres (SCHEFOLD et al., 2010). Além disso, alguns dos mecanismos como a hipóxia, a hipoperfusão e a lesão endotelial, também são responsáveis pela liberação de radicais livres capazes de participar na defesa contra processos infecciosos, mas também de produzir danos nas estruturas celulares e tecidos, ativando e perpetuando a resposta inflamatória (SCHEFOLD et al., 2010).

A condição metabólica conhecida pelo desequilíbrio entre a produção de ERO e antioxidantes no organismo *in vivo*, onde prevalece a produção de radicais livres, é chamada de estresse oxidativo. Essa condição é capaz de intermediar diversos danos a célula por meio da oxidação de biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA (BARREIROS et al., 2006; VASCONSELOS et al., 2007; VALKO et al., 2007). Como os pacientes críticos são mais vulneráveis para síntese de agentes oxidantes e apresentam deficiência de agentes



antioxidantes, o declínio muscular nesses pacientes se torna mais exacerbado, bem como a proliferação da cascata inflamatória. É importante destacar que a produção de espécies reativas ocorre normalmente no organismo, pois diferentes funções fisiológicas utilizam reações de óxido-redução em alguma etapa do seu processo. Por outro lado, o organismo conta com uma série de substâncias (enzimas e moléculas) cuja função é neutralizar essas espécies quando produzidas em excesso. O delicado balanço entre a produção/consumo desses compostos é chamado de regulação redox, que mantém a homeostase redox in vivo (VALKO et al., 2006).

No contexto da cascata inflamatória, o aumento de TNF- $\alpha$  é apontado na literatura como importante contribuinte da fraqueza muscular através de dois principais mecanismos: promoção da atrofia e indução da disfunção contrátil (REID et al., 2001). Além do TNF- $\alpha$ , outras citocinas atuam no eixo da inflamação do músculo durante a doença crítica. Os macrófagos ativados no tecido inflamado secretam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF- $\alpha$  que dirige a resposta pró-inflamatória sistêmica, sendo também liberados na miosina do músculo esquelético. Entretanto, a IL-6, é a citocina predominantemente liberada na miosina, o que contribui para inibição da liberação de IL-1 e TNF- $\alpha$  e estimula a produção de IL-10, citocinas anti-inflamatórias (Figura 3) (FRIEDRICH et al., 2015).

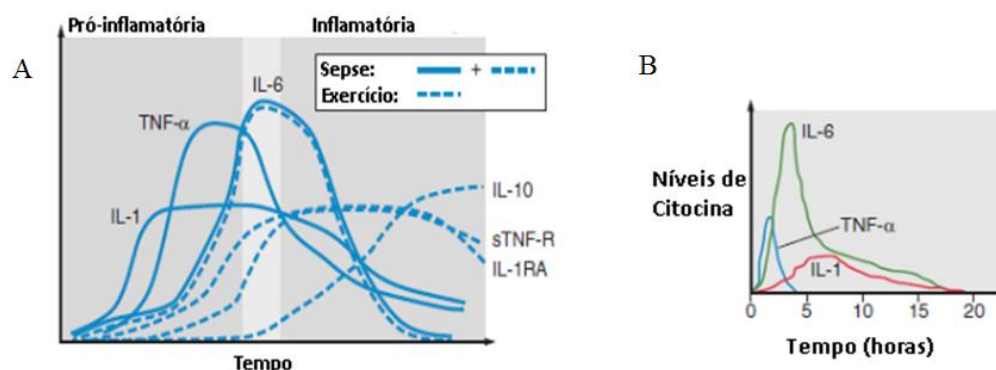


**Figura 3:** Resume o local (músculo) e interação sistêmica de citocinas.

**Fonte:** Modificada de (FRIEDRICH et al., 2015).

Durante a sepse e o exercício, ocorre um aumento inicial de IL-1 e TNF- $\alpha$ , citocinas pró-inflamatórias, seguido por um aumento nos níveis de IL-6 que exerce tanto efeito, pró-inflamatório como anti-inflamatório. Além das propriedades pró-inflamatórias, altos níveis de IL-6 agem para estimular o aparecimento de citocinas anti-inflamatórias no plasma,

incluindo IL-10 e IL-1R $\alpha$ . (Figura 4A). 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 4B). Essa atuação mais curta do TNF- $\alpha$ , deve-se ao fato de as IL-6 derivadas dos músculos reduzirem a produção de TNF- $\alpha$ , interrompendo a degradação muscular (FRIEDRICH et al., 2015).



**Figura 4A e 4B:** Decurso no tempo de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na circulação sistêmica durante a doença crítica.

**Fonte:** Modificada de (FRIEDRICH et al., 2015).

A supressão de citocinas pró-inflamatórias como, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , podem beneficiar pacientes criticamente enfermos. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, inicialmente identificada pela sua capacidade para desligar a produção de citocinas pelas células T. Estudos têm demonstrado que a IL-10 inibe a síntese de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , intermediários reativos de oxigênio, e outros fatores pró-inflamatórios, suprimindo várias respostas imunes através de ações individuais sobre vários tipos de células (REID, 2011).

Estudos sugerem que o exercício faça com que haja uma ação anti-inflamatória 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. Assim, o exercício físico é explorado como um agente regulador da inflamação e da função muscular. Já a EENM através da corrente elétrica (*Functional Electrical Stimulation* - FES) está como uma das principais formas de prevenção na função muscular do paciente crítico, entretanto seus efeitos na cascata inflamatória e sobre o estresse oxidativo ainda são desconhecidos (WINKELMAN et al., 2007).

## 2.4 MOBILIZAÇÃO PRECOCE NO PACIENTE CRÍTICO

A doença crítica, associada ao imobilismo e a todo o processo inflamatório decorrente, causa uma série de complicações que poderão deixar sequelas em diferentes níveis nos pacientes. Um delas, a fraqueza muscular adquirida, irá acarretar não somente redução nos níveis funcionais, mas também, o aumento no tempo de VM, de internamento hospitalar e, conseqüentemente, o aumento da mortalidade. Dessa forma, ao longo dos anos, buscaram-se alternativas para amenizar os efeitos devastadores da doença crítica e, com isso, a fisioterapia passou a ter papel primordial na prevenção e recuperação da funcionalidade muscular nesses pacientes (DE JONGUE et al., 2007).

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 (NEMET et al., 2002). Nesse contexto, a mobilização precoce surge como um recurso seguro, viável e que possui diversos benefícios aos pacientes internados em UTI, dentre eles a manutenção da amplitude de movimento articular, prevenção e reversão de retrações musculares, manutenção e recuperação da força muscular e da função física do paciente. Estudos recentes evidenciam que esse recurso produz efeitos significativos em desfechos clínicos importantes como, menor tempo de VM, melhor funcionalidade e qualidade de vida pós alta da UTI, menor tempo de internamento na UTI e hospitalar, redução de mortalidade, bem como redução de custos hospitalares (FRIEDICH et al., 2015).

A possibilidade de mobilizar o paciente ainda na fase aguda sob uso de sedativos e VM, se tornou um ponto chave na recuperação da doença crítica, principalmente porque as evidências mostram que é na primeira semana de internamento e restrição ao leito que ocorre a maior perda de massa muscular, podendo chegar a 25% da massa total. Dessa forma, percebe-se que a fisioterapia através de protocolos de mobilização precoce, é essencial para preservação e recuperação da funcionalidade desses pacientes. (FRIEDICH et al., 2015; DE JONGUE et al., 2007; NEMET et al., 2002).

Os protocolos de mobilização precoce são diversos e baseados na rotina de cada instituição, respeitando as condições e capacidades individuais dos pacientes, incluindo uma progressão de exercícios que vão desde a mobilização passiva, exercícios progressivas de transferências de decúbito no leito, EENM, transferências para fora do leito (poltrona ou

ortostatismo), exercícios de treino de equilíbrio em ortostatismo e atividades pré-marcha até alcançar a deambulação (MORRIS et al., 2008).

Seweickert et al. (2009), relataram que pacientes submetidos a um protocolo de mobilização precoce são capazes de sair do leito com maior frequência e, ocasionalmente, deambular com assistência durante o período de UTI e VM, enquanto aqueles que foram submetidos aos regimes de fisioterapia padrão adquiriram maior comprometimento funcional e necessitaram de um maior tempo de recuperação. Além disso, a mobilização precoce apresentou impacto positivo sobre o delírio na UTI, já que se observou menor aparecimento e maior reversão 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 insulinoterapia 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 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 expostos a VM (BHAKTI et al., 2014).

#### 2.4.1 Estimulação Elétrica Neuromuscular

A EENM consiste em um recurso não invasivo que utiliza a aplicação de corrente elétrica em pontos motores nos músculos através de eletrodos, proporcionando a despolarização de axônios motores para contração e excitação celular. A contração muscular resultante do potencial gerado no axônio, parece ser idêntica a contração muscular fisiológica, sendo dessa forma útil na reabilitação de pacientes críticos, visto que sua aplicação independe de cooperação (RODRIGUES et al, 2012).

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 (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 ainda 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 a 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. A mobilização destas células em resposta a EENM podem expressar um potencial efeito benéfico sobre a função endotelial no paciente crítico, uma vez que está associada à regeneração endotelial e ao processo de neovascularização no músculo lesionado pelo processo inflamatório. (STEFANOUE et al., 2016; ANGELOPOULOS et al., 2013; GEROVASILI et al., 2009).

A EENM já é bastante utilizada em pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) grave sob ventilação mecânica. AKAR et al. (2015), investigaram o impacto da mobilização ativa e da EENM na força muscular e em mediadores inflamatórios nessa população e observaram melhora significativa na força muscular periférica, principalmente de extremidades de membros inferiores, nos grupos que realizaram EENM e exercícios e EENM exclusivamente. Com isso, os autores concluíram que a EENM sozinha e associada à mobilização ativa parece apresentar melhores resultados. Com relação aos níveis de citocinas inflamatórias (IL - 6 e IL -8), os achados mostraram redução no grupo de pacientes submetidos a EENM. Apesar dos resultados promissores, poucos estudos abordam esta temática, sendo necessárias, pesquisas futuras para obtenção de resultados mais conclusivos sobre os efeitos da eletroterapia em relação ao sistema imune quando empregados em pacientes críticos (AKAR et al., 2015).

### 3 MÉTODOS

O estudo foi dividido em duas fases: Na 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 o paciente preenchendo os critérios, 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) e avaliava ainda a utilização de corticoesteróides, de BNM, sedativos e drogas vasoativas. 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 dois grupos estudados e posterior aplicação da intervenção. A ficha de avaliação utilizada durante o período de coletas segue no **Apêndice A**.

#### 3.1 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O estudo foi realizado na UTI geral do Hospital Agamenon Magalhães (HAM) durante o período de junho de 2015 a outubro de 2016, sendo a análise do estresse oxidativo e das citocinas inflamatórias realizada no Laboratório de Microbiologia do LIKA.

#### 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**.

Foram internados inicialmente 161 pacientes portadores de patologias diversas que foram submetidos à VM, dos quais 138 entraram nos critérios de exclusão do estudo e apenas 23 pacientes foram incluídos na pesquisa, porém 4 desses pacientes, não conseguiram terminar suas análises, pois apresentaram critérios para descontinuação na pesquisa. Portanto, apenas 19 pacientes finalizaram suas análises, sendo distribuídos da seguinte forma: grupo controle (n=10); pacientes que não realizavam nenhum tipo de intervenção terapêutica no momento de realização do protocolo do estudo e o grupo EENM (n=9); pacientes submetidos

à EENM do músculo quadríceps. A ordem de entrada nos grupos foi realizada aleatoriamente por meio do programa WinPepi (PEPI-for-Windows).

A figura 5 mostra o fluxograma de seleção e alocação dos pacientes críticos sob VM.

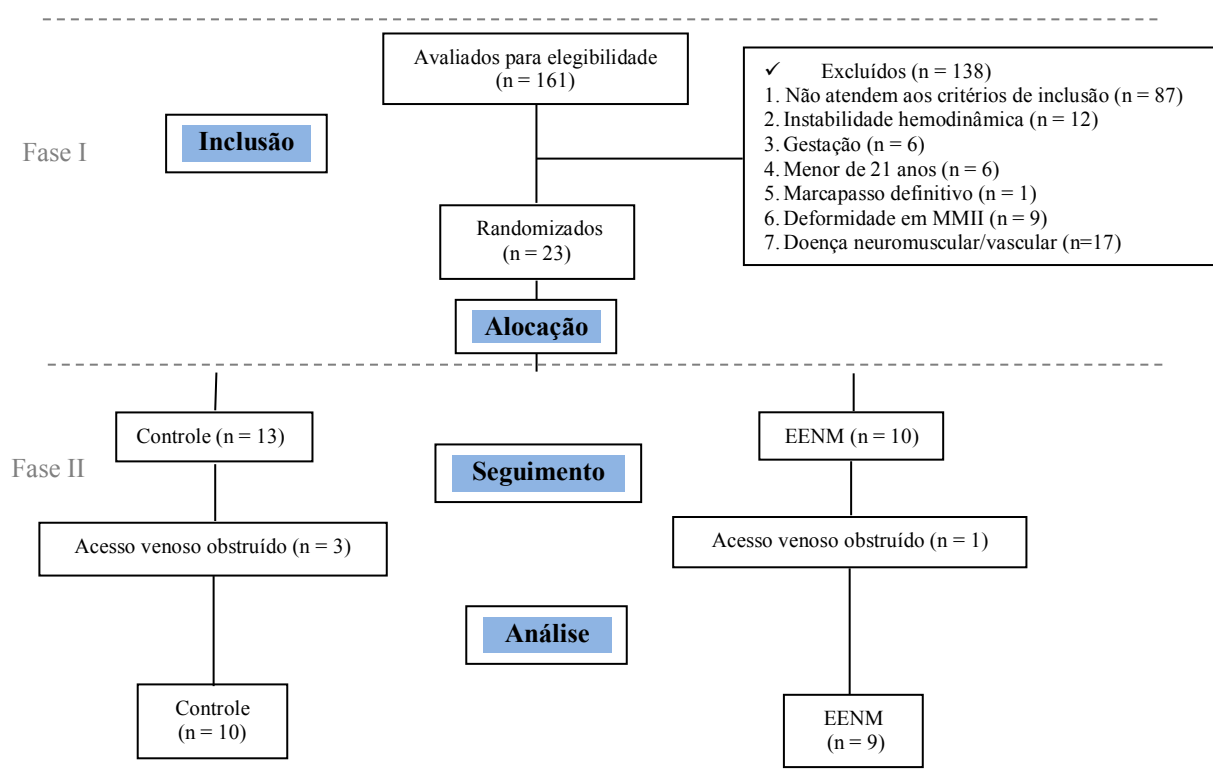


Figura 5. Fluxograma de seleção e alocação dos pacientes críticos sob VM de acordo com o CONSORT 2010.

### 3.3 TAMANHO DA AMOSTRA

O cálculo amostral foi realizado através do 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 pacientes que estiveram sob VM neste período, avaliados na primeira fase da pesquisa e levando em consideração uma taxa de realização de EENM de 1% (CARSTENS et al, 2013), com uma perda amostral de 20%, foi totalizada uma amostra mínima de 18 pacientes.

### 3.4 MÉTODOS E TÉCNICAS DE INVESTIGAÇÃO

#### 3.4.1 Critérios de inclusão

Foram considerados como critérios de inclusão: 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 favoráveis, demonstrados pela concentração da hemoglobina (Hb) > 7gramas/dL, temperatura < 38°C, contagem de plaquetas > 20.000 células/mm<sup>3</sup>, sem febre e alteração na contagem de leucócitos.(STILLER et al. 2007).

#### 3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes menores de 21 anos, gestantes, pacientes com índice de massa corpórea (IMC) > 35 Kg/m<sup>2</sup>, doença neuromuscular e vascular, lesões na pele no lugar colocação do eletrodo, fratura não consolidada e utilização de marcapasso cardíaco.

#### 3.4.3 Critérios de Descontinuação

Mesmo após a randomização, alguns pacientes foram excluídos da pesquisa, pois apresentaram obstrução do acesso venoso durante a aplicação do protocolo, o que impossibilitou a coleta do sangue e conseqüentemente a continuidade da pesquisa.

### 3.5 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 dois grupos foram realizadas utilizando-se o Mann-Whitney Test. 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 analisados foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

### 3.6 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

Terminada a avaliação inicial, os pacientes elegíveis para o estudo foram submetidos à coleta de 12ml de sangue venoso, através do acesso venoso, antes e depois de uma hora do protocolo de estudo, 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 12ml de sangue foram distribuídos em 3 tubos a vácuo (Vacutainer®) com EDTA dipotássico de 4ml, sendo levados para análise do estresse oxidativo e citocinas inflamatórias no Laboratório de Imunologia Keiso Azami (LIKA).

#### 3.6.1 Estresse oxidativo

**Obtenção de monócitos a partir do sangue periférico:** Os monócitos foram obtidos a partir de 10 dos 12ml de sangue proveniente 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 (10 ml de sangue + 10 ml 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 (PBMC) que foi transferida para outro tubo de ensaio. Foi adicionada a mesma quantidade do aspirado de PBS e centrifugados por 15 minutos nas mesmas condições anteriores.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 1 ml 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 de E. coli (LPS):** Em cada grupo a concentração foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células em 1 ml de meio de cultura em cada poço da placa. Em seguida, as células foram tratadas na dose de 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS por 24 horas.

A avaliação da liberação de ON foi realizada utilizando-se o método de GRIESS. Em seguida, foram adicionados 50 $\mu\text{l}$  do reagente de GRIESS (1g de sulfanilamide, Sigma 9251; 0,1g de N-(Naphthyl) Ethylenediamine Dihydrochloride – Sigma 5889; 2,5 ml 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  $\mu\text{M}$ .

### 3.6.2 Citocinas Inflamatórias

**Quantificação das Interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10), do TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$**  : Os níveis séricos de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram determinados pela técnica de ELISA, com a utilização *kits* comerciais de ELISA para IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  (Invitrogen, Manufacturing Site Invitrogen, Camarillo, Califórnia, USA) e TNF- $\alpha$  (BioSource® TNF- $\alpha$  EASIA, Nivelles, Belgium, Europe) de acordo com as instruções do fabricante.

Na 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.

### 3.7 PROTOCOLO DO ESTUDO

A randomização para participação em um dos dois grupos foi realizada de forma aleatória 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 convencional no período em que esteve na UTI.

Os pacientes randomizados para o grupo EENM de membros inferiores utilizaram a corrente FES (Figura 6) 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 de quatro canais; Ibramed; São Paulo, Brasil), que foi programado para o fortalecimento muscular com uma largura de pulso de 500 $\mu$ sec, frequência de 50Hz, 2 segundos de elevação, 5 segundos de sustentação e 2 segundos de 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, realizávamos 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 6:** Ilustração da aplicação da estimulação elétrica muscular (EENM) no quadríceps em pacientes críticos sob VM. (quadríceps – reto femoral e vasto lateral).

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

### 3.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Essa pesquisa é parte de um projeto maior já aprovado 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 HÁ

## 4 RESULTADOS

Foram avaliados inicialmente 161 pacientes portadores de patologias diversas, dos quais 138 entraram para os critérios de exclusão, restando 23 pacientes que foram randomizados entre os dois grupos, porém destes, apenas 19 pacientes finalizaram suas análises, sendo distribuídos da seguinte forma: grupo controle (n=10) e grupo EENM (n=9).

Tabela 2 mostra as variáveis demográficas e clínicas dos pacientes de cada um dos grupos: controle e EENM sendo apresentadas através de média e desvio padrão. Na comparação entre os grupos, não foram observadas diferenças significativas entre os valores de idade, altura, peso, IMC, APACHE II, balanço hídrico (BH) nas últimas 24h, tempo de VM e de internamento em UTI, 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 (T), o que demonstra que os grupos foram homogêneos entre si. Nesta mesma tabela foram descritas as razões principais para admissão do paciente na UTI, assim como, suas comorbidades.

**Tabela 2:** Variáveis demográficas e clínicas, causas da admissão e comorbidades entre o grupo eletroestimulado e o grupo controle.

Váriaveis demográficas e clínicas	Grupos		Valor p*
	Controle (n=10)	EENM (n=9)	
Idade (anos)	56,80±12,80	64,11±18,19	0,368
Altura (cm)	164,70±8,82	161,78±6,26	0,512
Peso (Kg)	71,10±13,37	66,67±9,35	0,481
IMC (Kg/cm2)	25,92±4,02	26,19±3,29	0,567
APACHE II	22,60±4,22	20,78±5,58	0,593
BH -24h (ml)	972,20±703,84	993,78±551,04	0,870
RASS	-4,50±0,707	-4,44±0,726	0,853
T VM (dias)	4,9±2,80	5,67±3,35	0,563
T UTI (dias)	4,70±2,45	7,22±5,91	0,483
HGT	156,80±66,97	158,11±56,35	0,806
Cst (ml/cmH2O)	32,88±10,48	30,55±11,06	0,252
Rsr (cmH2O/L/s)	13,65±5,11	12,33±1,73	0,803
FC (bpm)	81,70±18,80	88,33±19,71	0,414
SpO2 (%)	97,90±1,96	97,44±2,92	1,000
PAS (mmHg)	135,80±2727,21	124,44±22,73	0,369
PAD (mmHg)	77,90±16,01	69,33±9,31	0,190
Temperatura (°C)	36,30±0,67	36,94±0,71	0,038
Razão primária para admissão			
Problema respiratório	4 (40,0)	5 (55,5)	—
Problema cardíaco	2 (20,0)	2 (22,2)	—
Infecção	2 (20,0)	1 (11,1)	—
Outros	2 (20,0)	1 (11,1)	—
Condição de comorbidade			
Respiratória	2 (20,0)	2 (22,2)	—
Cardíaca	3 (30,0)	1 (11,1)	—
Endócrina	1 (10,0)	1 (11,1)	—
Urinária	1 (10,0)	2 (22,2)	—
Falência renal crônica	2 (20,0)	2 (22,2)	—
Infecção	1 (10,0)	3 (33,3)	—

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

\* Teste de Mann-Whitney.

Definição das abreviações: IMC = índice de massa corpórea; APACHE II= *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*; BH -24h = balanço hídrico nas últimas 24 horas; T VM = tempo de ventilação mecânica; T UTI = tempo de unidade de terapia intensiva; HGT = valores do hemoglicoteste; Cst sr= complacência estática do sistema respiratório; Rsr = resistência do sistema respiratório; FC = frequência cardíaca; SpO2 = saturação periférica de oxigênio; PAS = pressão arterial sistólica e PAD = pressão arterial diastólica.

A Tabela 3 demonstra as médias 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 o grupo eletroestimulado e para o grupo controle. Foi observada redução significativa na produção de ON nas células C+ e C-, comparando o antes com o depois no grupo submetido à EENM. Já para o grupo controle não foi encontrada nenhuma alteração significativa, demonstrando que EENM, mostrou-se eficaz na redução do estresse oxidativo celular.

**Tabela 3:** Produção do ON cultivado no monóxido, no C+ e C- avaliados nos instantes antes e depois do grupo eletroestimulado e no grupo controle.

Óxido nítrico	Controle (n=10)		EENM (n=9)		Valor p*
	<u>Antes</u>	<u>Depois</u>	<u>Antes</u>	<u>Depois</u>	
<b>ON (C+)</b> ( $\mu$ M)	10,78 $\pm$ 5,6	11,51 $\pm$ 6,4	8,19 $\pm$ 3,4	6,96 $\pm$ 2,4	
	<b>p = 0,3123</b>		<b>p = 0,0188</b>		
<b>ON (C-)</b> ( $\mu$ M)	10,30 $\pm$ 5,9	11,84 $\pm$ 7,2	8,64 $\pm$ 2,7	7,19 $\pm$ 2,6	
	<b>p = 0,2852</b>		<b>p = 0,0258</b>		

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 e EENM = Estimulação elétrica neuromuscular.

A Tabela 4 mostra os valores das citocinas: TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL-6 e IL- 10, avaliadas nos instantes antes e depois para o grupo eletroestimulado e para o grupo controle, através de médias e desvio padrão. Não foram observadas diferenças significativas para os valores das citocinas avaliadas em ambos os grupos.

**Tabela 4:** Valores das citocinas; TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL-6 e IL- 10, avaliados nos instantes antes e depois no grupo eletroestimulado e no grupo controle.

Citocina	Grupos				Valor p*
	Controle (n=10)		EENM (n=9)		
	<u>Antes</u>	<u>Depois</u>	<u>Antes</u>	<u>Depois</u>	
<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	
	p=0,4359		p=0,1949		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	
	p = 0,7394		p = 0,7984		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	
	p=0,9705		p=0,7984		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	
	P=0,7394		p=0,7984		Valor p*

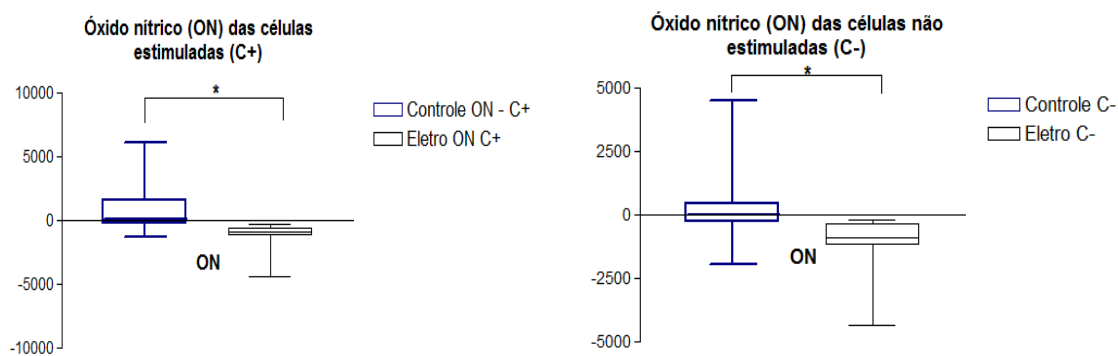
Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

\* 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 e EENM = Estimulação elétrica neuromuscular.

As figuras 7a e 7b representam a variação dos valores do ON nos monócitos estimulados, (C+) e não estimulados, (C-), antes e depois do protocolo de estudo para ambos os grupos. Nestas figuras percebe-se uma redução da variação da produção do ON do monócito estimulado (p= 0,003) e não estimulado (p=0,003) no grupo que realizou a EENM quando comparado ao grupo controle.





**Figura 7a e 7b.** Média  $\pm$  desvio padrão dos valores do óxido nítrico (ON) da célula estimulada controle positivo (C+) e não estimulada (C-), dos dois grupos estudados: controle e EENM. \* Teste Mann-Whitney para amostras independentes. Diferenças entre o grupo controle e EENM. **7a.** (\*  $p=0,003$ ) e **7b.** (\*  $p=0,003$ ).

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que uma única sessão de aplicação da estimulação elétrica neuromuscular, foi capaz de provocar redução significativa do estresse oxidativo, efeito demonstrado através da redução nos valores do ON no grupo que realizou a intervenção quando comparado ao grupo controle. Vale ressaltar o ineditismo do presente estudo, pois não existem na literatura estudos que descrevam os efeitos da EENM sobre o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias em pacientes críticos, no entanto, vários outros benefícios desta intervenção já foram amplamente comprovados, principalmente no que se refere à atenuação da perda de massa muscular e melhora da funcionalidade (MEESEN et al, 2010; GRUTHER et al, 2010; KARATZANOS et al, 2012).

Acredita-se que a redução do estresse oxidativo observada no presente estudo seja proveniente do efeito da EENM na atenuação dos prejuízos causados pelo imobilismo, através da ativação muscular. Esse resultado indica um provável efeito protetor e sistêmico deste recurso, mostrando que os benefícios ultrapassam o limite do músculo eletroestimulado. Desta forma, a EENM pode ser uma importante contribuinte não apenas na recuperação funcional e muscular, mas também na recuperação clínica dos pacientes críticos.

Efeitos sistêmicos que apontam benefícios da aplicação de uma sessão da EENM também já foram relatados previamente em outros estudos. 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, mostrando que a técnica possui potencial para prevenir a polineuropatia do doente crítico. De forma semelhante, Tanaka et al (2016), avaliaram 34 pacientes com infarto agudo do miocárdio submetidos a uma única sessão de EENM e observaram que no grupo que recebeu a aplicação da EENM houve aumento na função vascular endotelial, com benefícios na circulação sanguínea periférica, sem indução de sobrecarga cardiovascular. Outro estudo recente de Stefanou et al(2016), avaliaram 32 pacientes críticos sob VM com choque séptico após serem submetidos a uma sessão de 30 min de EENM e notaram migração de células endoteliais no grupo eletroestimulado, gerando restauração endotelial. Percebe-se então que alguns estudos

apresentam a EENM, como recurso capaz de gerar efeitos agudos com repercussão sistêmica, corroborando com os achados encontrados no presente estudo.

Outros autores já investigaram os efeitos crônicos da aplicação da EENM a nível sistêmico em populações distintas. David et al. (2009) estudaram os efeitos da EENM associada a uma dieta manipulada sobre o estresse oxidativo em pacientes com esclerose múltipla progressiva, e observaram redução da excito-toxicidade e do estresse oxidativo, associado a grandes ganhos de funcionalidade nesses pacientes. Semelhante, Bustamante et al (2008), ao estudarem os efeitos da estimulação elétrica no quadríceps de pacientes com DPOC grave sobre o estresse oxidativo, durante um período de 8 semanas, observaram que esta terapêutica foi bem tolerada e reduziu o estresse oxidativo. Por fim, Sharma et al (2010) avaliaram 20 pacientes com diagnóstico de diabetes do tipo II e sedentários, após um protocolo de aplicação da EENM por 2 semanas, e relataram redução no nível de glicose sanguínea no grupo intervenção, mostrando que a EENM pode ser útil no controle glicêmico de pacientes diabéticos. Deste modo, nota-se que a aplicação da EENM por períodos maiores mostrou importantes resultados sistêmicos. Entretanto, o presente estudo demonstrou efeitos benéficos com a aplicação de apenas uma sessão da EENM, o que sugere a possibilidade de melhores respostas com a progressão do tratamento também em pacientes críticos.

Assim como o estresse oxidativo, algumas citocinas selecionadas também influenciam na disfunção e degradação muscular em pacientes críticos. No presente estudo, não encontramos alterações significativas nos níveis séricos das citocinas avaliadas, após a aplicação de uma sessão da EENM., entretanto acredita-se que a aplicação desta terapêutica tenha efeitos benéficos sobre os parâmetros da resposta imune, como evidenciado por alguns autores. 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. Em outro estudo, Akar et al. (2015), estudaram pacientes com DPOC submetidos à VM com objetivo de investigar o impacto da mobilização ativa e da EENM na força muscular e nos mediadores inflamatórios. Os achados mostraram melhora significativa na força muscular periférica, principalmente de extremidades de membros inferiores, nos grupos que realizaram EENM e também redução nas citocinas inflamatórias, através da redução da IL-6.

Diante disso, acredita-se que provavelmente não foram encontradas alterações nos valores das citocinas inflamatórias no presente estudo, pois foi avaliado apenas o efeito

agudo, que pode não ter sido suficiente para alterar a cinética das citocinas, diferentemente dos estudos citados anteriormente que avaliaram após a aplicação de várias sessões da EENM. Outro fator que pode ter influenciado é o tamanho da amostra já que, Friedrich et al. (2015), demonstraram redução do TNF- $\alpha$  no plasma na primeira hora após realização do exercício físico, o que possivelmente justificaria redução após um hora de EENM, já que este recurso promove contração muscular semelhante a fisiológica.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Diante dos resultados apresentados, podemos concluir que a aplicação de uma sessão de EENM foi suficiente para reduzir os níveis de ON celular em pacientes críticos, evidenciando os efeitos benéficos da EENM na redução do estresse oxidativo para população estudada. Esses achados reforçam a contribuição desta terapêutica em reduzir os efeitos deletérios do imobilismo, principalmente nos pacientes que estão sob efeitos de sedação e VM sem realizar nenhum tipo de atividade física.

Em relação as concentrações das citocinas inflamatórias, não observamos alterações significativas. Dessa forma, sugere-se a realização de novos estudos que avaliem os efeitos crônicos e com uma maior amostra para que os resultados da aplicação deste recurso sejam mais conclusivos na população estudada.

## REFERÊNCIAS

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

CARSTENS, S. W. et al. Critical Illness Myopathy and glut4: Significance of insulin and muscle contraction. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 187, n. 4, p. 387-396, 2013.

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.

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.

ENGEL H. J. et al. ICU Early Mobilization: From Recommendation to Implementation at Three Medical Centers. *Critical Care Medicine*, v. 41, n. 9, p. 69-80, 2013.

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.

GEORGIOS, S. et al. Short and long term outcomes of ICU acquired weakness. *Health Science Journal*, v. 7, p. 188-200, 2013.

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.

GODOY, M. D. P. et al. Muscular weakness acquired in ICU (ICU-AW): effects of systemic neuromuscular electrical stimulation. *Rev Bras Neurol*, v.51, n. 4, p. 103-113, 2015.

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.

GRUTHER, W. et al. Effects of neuromuscular electrical stimulation on muscle layer thickness of knee extensor muscles in intensive care unit patients: A pilot study. *J Rehabil Me*, v. 42, p. 593-597, 2010.

KARATZANOS, E. et al. Electrical muscle stimulation: An effective form of exercise and early mobilization to preserve muscle strength in critically ill patients. *Crit Care Res Prac*, v.1, p.1-8, 2012.

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.

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.

MEESEN, R. L. J. et al. Neuromuscular Electrical Stimulation as a Possible means to prevent muscle tissue wasting in artificially ventilated and sedated patients in the intensive care unit: A Pilot Study. *Neuromodulation*, v.13, p.315-321,2010.

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.

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.

POULSEN, J. B. et al. Effect of transcutaneous electrical muscle stimulation on muscle volume in patients with septic shock. *Crit Care Med*, v. 39, n.3 , p. 1-6.

LORD, R.K. et al. ICU Early Physical Rehabilitation Programs: Financial Modeling of Cost Savings. *Critical Care Medicine*, v. 43, n. 3, p. 717-724, 2013.

RODRIGUEZ, P.O. et al. Muscle weakness in septic patients requiring mechanical ventilation: Prospective effect of transcutaneous neuromuscular electrical stimulation. *J Crit Care*, v.27, n. 3, p. 319-327.

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.

SHARMA, D. et. al. Effect of electrical stimulation on blood glucose level and lipid profile of sedentary type 2 diabetic patients. *Intern Jour of Diab*, v. 30, n. 4, p. 194-200, 2010.

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.

STEFANOUC, 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.

TANAKA, S. et. al. A Single Session of Neuromuscular Electrical Stimulation Enhances Vascular Endothelial Function and Peripheral Blood Circulation in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Int Heart J*, v. 57, n. 6, p. 676-681, 2016.

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.

REID, M. B.; LI Y-P. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res*, v. 2, p. 269–272, 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

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.

## **APÊNDICES E ANEXOS**

## APÊNDICE A: FICHA DE AVALIAÇÃO COLETA DE DADOS

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 Á 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:   ΔCONTROLE   ΔELETROESTIMULAÇÃO   ΔEXERCÍCIO PASSIVO   ΔEXERC. + 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 ELETROTERAPIA	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/m <sup>2</sup>
Hemodinâmica - Administração de novo agente vasopressor.	Assincronia paciente ventilador	Doença neuromuscular	Doença vascular
Status cardíaca - Novo infarto cardíaco - Arritmia - Isquemia cardíaca nova	FIO <sub>2</sub> >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 PCO <sub>2</sub> <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 ACEITO PARA PUBLICAÇÃO



CLINICAL SCIENCE

## 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 Lamenha,<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, Lamenha 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-myocardial 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-α), interferon gamma (IFN-γ) 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 1:200 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 µg/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 × 10<sup>6</sup> 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 × 10<sup>6</sup> cells in 1 ml of culture medium to each well. The cells were treated at a dose of 10 µg/ml of LPS for 24 hours. The NO evaluation release was performed using the GRIESS method. First, 50 µl 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 µM.

## Analysis of immune system parameters by quantification of IL-6, IL-10, TNF-α and IFN-γ

Serum levels of IL-6, IL-10, TNF-α and IFN-γ were determined using ELISA commercial kits for IL-6, IL-10, TNF-α and IFN-γ (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, hemoglucotest (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



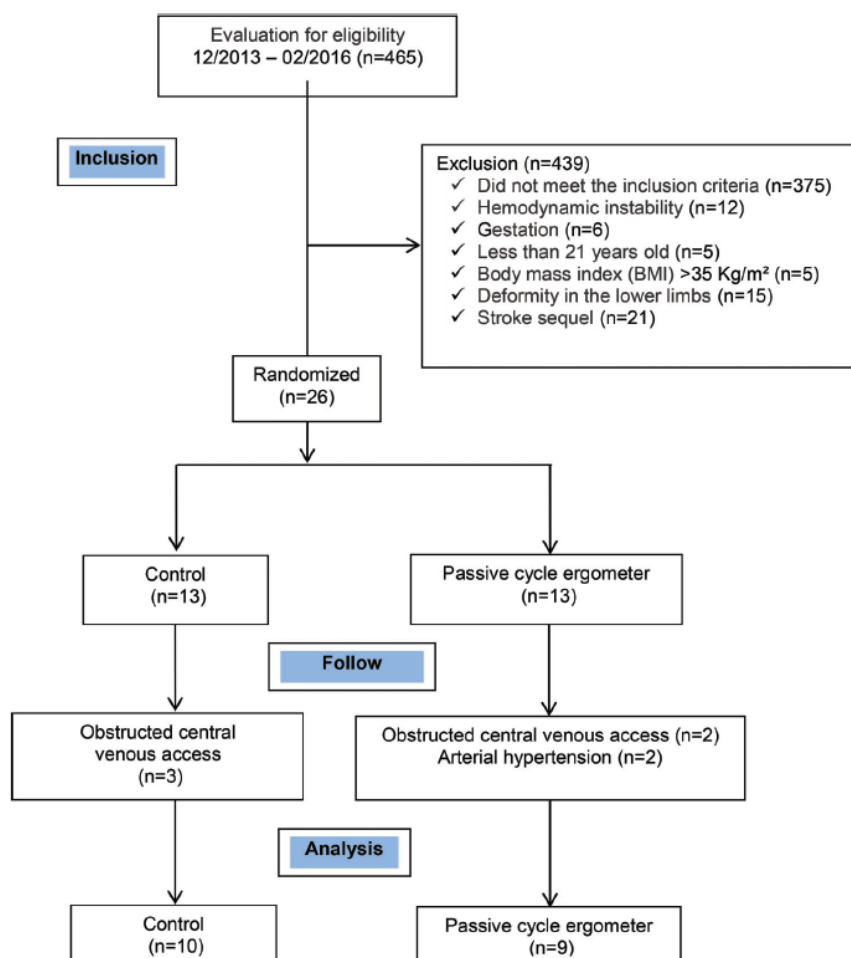


Figure 2 - Flowchart of the patients who participated in the study.

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

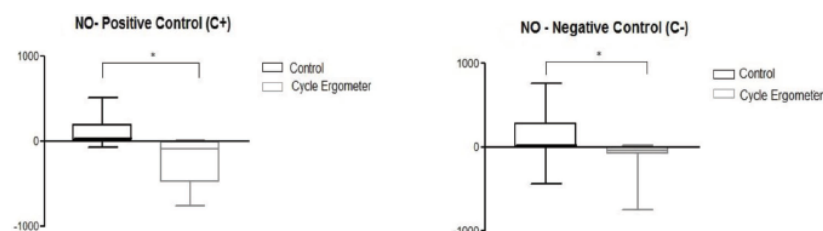
**Table 1** - Comparison of demographic and clinical variables between the two groups.

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); hemoglucotest (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.



**Table 2** - Comparison of cytokine measurements before and after for the control and passive cycle ergometer groups.

Cytokines	Control (n=10)		Passive cycle ergometer (n=9)		
	Before	After	Before	After	
TNF- $\alpha$	3.05 (2.83-3.22)	2.91 (2.70-3.30)	3.35 (2.72-3.59)	2.87 (2.74-3.28)	
IFN- $\gamma$	1.88 (1.87-1.91)	1.88 (1.86-1.91)	1.91 (1.86-1.95)	1.92 (1.87-1.98)	$p^*$ value
IL-6	2.87 (2.42-3.86)	2.67(2.33-3.61)	2.37 (2.30-2.96)	2.39 (2.23-2.88)	$p^*$ value
IL-10	1.86 (1.83-1.93)	1.85 (1.83-1.93)	1.91 (1.88-1.93)	1.92 (1.91-1.93)	$p^*$ value

Proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6) and antiinflammatory properties (IL-10).

Values written in bold are statistically significant.

Data are the median (25 – 75% percentile) before and after testing.

\*Wilcoxon test.

TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor alpha; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; IL-6, interleukin 6; IL-10, interleukin 10.

Muscle contraction induces IL-6 production and release to the plasma in large quantities. An increase of up to 100 times the initial value can be found in some studies in humans. The synthesis of IL-6 during exercise is independent of the production of TNF- $\alpha$ . During exercise, even low intensity, IL-6 is also synthesized and put into circulation by the muscle-tendon and fatty tissues (20).

Apart from its proinflammatory properties, high levels of IL-6 act to stimulate the emergence of antiinflammatory cytokines in the plasma, including IL-10 and IL-1R  $\alpha$ . IL-6 derived from muscles reduces the production of TNF- $\alpha$ , interrupting the muscle degradation through the destruction of myosin (18).

The abolition of proinflammatory cytokines such as IL-6, particularly the powerful IL- $\beta$  1 and TNF- $\alpha$ , can benefit the critically ill. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that is initially identified by its ability to interrupt the production of cytokines by T cells. Investigations have shown that IL-10 inhibits the synthesis of IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , reactive oxygen intermediates and other proinflammatory factors, suppressing various immune responses through individual actions on multiple cell types.

After exercise, high circulating IL-6 levels are followed by increased production of IL-10. Studies suggest that exercise has an antiinflammatory action by inducing IL-10 and IL-6 and inhibiting TNF- $\alpha$  and IL- $\beta$  1. The cellular messengers IL-6 and IL-10 are involved in the maintenance of muscle function during stretching and some exercise types. Exercise is used as an inflammation regulator and muscle function (18). The truth is that important clinical implications have been demonstrated with physical exercise and neuromuscular electrical stimulation (NMES) as some of the main prevention factors in the muscle function of critical patients.

Although changes in inflammatory cytokines in a single session using the cycle ergometer were observed, we believe that the implementation of the passive cycle ergometer has beneficial effects on this response, similar to a report by Karavidas et al. (21) who studied the application of six weeks of NMES in the lower limbs of patients with severe heart disease. They observed that NMES could promote a direct effect on endothelial function and the peripheral markers of antiinflammatory activation with reduced levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 and improved blood flow in the brachial artery observed by ultrasound with doppler. These cytokines may systemically act as anabolic muscle and enhance stimulus catabolic effects of critical illness and paralysis. NMES and

exercise can also activate a bioenergetics pathway that systemically improves the mitochondrial function of skeletal muscles.

In another study evaluating the effects on the immune system, after a total of 20 sessions, Akar Olcay et al. (22) studied patients with COPD under MV whose objective was to investigate the effect of active mobilization and NMES in the weaning process, discharge and inflammatory mediators. A total of 30 patients were divided into three groups with 10 patients in each group: group 1 was submitted to active mobilization of extremities and NMES, group 2 was submitted to NMES, and group 3 only underwent active mobilization of extremities. Significant improvement was observed in peripheral muscle strength, particularly of the lower extremities, in the groups that performed NMES and exercises and NMES exclusively. In addition, a reduction of IL-6 and IL-8 in patients submitted to NMES was observed.

It is too early to draw any firm conclusions from our findings. However, we can conclude that passive cycle ergometry on the lower limbs was enough to reduce NO levels in cells compared to the control group, showing the benefits of passive exercise on oxidative stress reduction in the study population. Regarding the behaviour of the inflammatory cytokines evaluated in this study, we observed that the use of the passive cycle ergometer did not cause changes in the immune system. However, additional research in a larger population is necessary for more conclusive results.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All of the authors participated in the design, interpretation of studies, data analyses and review of the manuscript. França EE, Ribeiro IC, Lamenha GG, Magalhães IK, Figueiredo TG, Costa MJ, Elihimas-Júnior UF and Barbara Feitosa BL participated in the realization of experiments and laboratory analysis of oxidative stress and inflammatory cytokines. Andrade MA and Castro CM guided the research elaboration. Correia-Júnior MA and Ramos FF wrote the manuscript and performed the statistical analysis.

## REFERENCES

- Chiang LL, Wang LY, Wu CP, Wu HD, Wu YT. Effects of physical training on functional status in patients with prolonged mechanical ventilation. *Phys Ther.* 2006;86(9):1271-81, <http://dx.doi.org/10.2522/ptj.20050036>.
- De Jonghe B, Bastuji-Garin S, Durand MC, Malissin I, Rodrigues P, Cerf C, et al. Respiratory weakness is associated with limb weakness and delayed weaning in critical illness. *Crit Care Med.* 2007;35(9):2007-15, <http://dx.doi.org/10.1097/01.ccm.0000281450.01881.d8>.
- Topp R, Dittmyer M, King K, Doherty BS, Hornyak J 3rd. The effect of bed rest and potential of prehabilitation on patients in the intensive care unit.



- 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, Boussacarc 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, Phippen 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 Anestesiol*. 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.

