



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

JOÃO RICARDHIS SATURNINO DE OLIVEIRA

**POTENCIALIZAÇÃO DE EFEITOS COLATERAIS EM MODELO DE ATROFIA
POR DESUSO DECORRENTE DE CORTICOTERAPIA**

Recife
2018

JOÃO RICARDHIS SATURNINO DE OLIVEIRA

**POTENCIALIZAÇÃO DE EFEITOS COLATERAIS EM MODELO DE ATROFIA
POR DESUSO DECORRENTE DE CORTICOTERAPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia. Área de Concentração: Ciências Biológicas II.

Orientador (a): Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

RECIFE
2018

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Oliveira, João Ricardhis Saturnino de
Potencialização de efeitos colaterais em modelos de atrofia por desuso decorrente de
corticoterapia / João Ricardhis Saturnino de Oliveira – 2018.

73 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Vera Lucia de Menezes Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia,
2018.

Inclui referências e anexos.

1. Sistema musculoesquelético 2. Atrofia muscular 3. Metabolismo I. Lima, Vera
Lucia de Menezes (orient.) II. Título

611.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-217

JOÃO RICARDHIS SATURNINO DE OLIVEIRA

**POTENCIALIZAÇÃO DE EFEITOS COLATERAIS EM MODELO DE ATROFIA
POR DESUSO DECORRENTE DE CORTICOTERAPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia. Área de Concentração: Ciências Biológicas II.

Aprovada em: 03 /08 /2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Ana Paula Sant'Anna da Silva
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Caique Silveira Martins da Fonseca
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

*Aos mestres, que estimulam seus discípulos a seguir o caminho do conhecimento
para a expansão do ser humano.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos deuses em suas respectivas religiões, às forças da natureza e às leis que definem e transformam o universo. Embora alheio, sinto-me acolhido e integrado a todos.

Agradeço à minha mãe Maria, da pele áspera e coração aveludado, pelo amor, ternura e liberdade a mim dados; ao meu pai João, pelo exemplo e o nome que carrego com tanto carinho; e à minha mãe Andreia, por me gerar, ainda que incerto fosse o meu destino. Agradeço ainda aos meus irmãos Bruno e Raquel por me permitirem ser o primogênito e o caçula ao mesmo tempo.

Agradeço aos meus sobrinhos Bruna e Bruno Jr., por me lembrarem sempre que estou mais velho e que tenho mais experiências a compartilhar. Também agradeço aos meus avós queridos, dona Marina e seu Antonio, minhas tias, tios, primos e demais familiares, por comporem esta vasta família. Em especial, agradeço aos meus padrinhos Marli e Luis, pelo carinho e suporte.

Agradeço a esta Universidade pela oportunidade de desfrutar de seus meios para minha maturação como profissional e ser humano.

Agradeço aos meus mestres do ensino fundamental, Amaro, Carmem, Idonéas, Leila e Lupércio; do ensino médio, Conceição, Paulo e Sergio; e, do ensino superior, Alberto, Graça Araújo e Vera Cristina; além dos demais professores do Colégio Betel, Escola Municipal Dom Bosco, Trajano de Mendonça, da Universidade Federal de Pernambuco e da West Virginia University, dos quais tive a oportunidade de receber carinho, conhecimento e estímulo para seguir minha vida acadêmica.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Vera Lucia de Menezes Lima e a todos os companheiros científicos que o LABDPN e o Departamento de Bioquímica me apresentaram: Albérico, Sr. Alex, Ana Paula, Bianka, Bruno, Caique, Cristiane, Douglas, Fabiola, Fernanda, Janaina, Sr. João, José, Marília, Pamela, Priscila Passos, Rebeca, Tatiana, Thaise, Tiago, Vanderlan e Weber, por suas companhias, confiança e exemplos.

Obrigado aos meus amigos de longa e curta data que, de perto ou de longe, estiveram presentes em minha vida. Em especial, listo Amanda, Bk, Bruna, Daniela, Dayana, Dudoni, Juci, Kleythy, Lays, Ling, Marina, Marília, Nico, Pora, Rafa, Reidiane, Sandra, Suetonio, a Família 84, os amigos da Turma 87, os amigos do CEPJCD, os amigos do Trajano, do EMDB e do Betel.

Também sou grato às minhas amigas importadas Ana Claudia, Ana Tereza e Julieta, pela companhia e carinho, além da galera G3-WVU, Angélica, Jéssica e Mariana. Em especial, agradeço aos amigos estrangeiros Archil, María, Matt B, Matt M e Yuko, pela amizade e troca de culturas.

Agradeço ao Dr. Alway e ao Dr. Mohamed pelos ensinamentos, respeito, confiança e oportunidade dados a mim.

Agradeço à equipe de Fisioterapia e da UTI do HEMOPE pela amizade e confiança; em especial, à Ana Tereza, Ana Emanuella, Andreia, Anselmo, Daniella, Jailson, Jaciara, Samia e Vânia.

Agradeço e peço desculpa aos pequeninos camundongos que participaram deste trabalho. Sem vocês, eu não conseguiria.

Agradeço ainda a todos que direta ou indiretamente passaram por minha vida e de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

"Pode-se ver o céu pela janela, mas é perdendo o telhado que se contempla as estrelas."

(O autor, 2018)

RESUMO

Imobilização e corticoterapia, separadamente, afetam o sistema musculoesquelético e causam alteração do metabolismo energético. Espera-se que a associação destas potencialize os danos, mas não há estudos que quantifiquem este prejuízo. Deste modo, esta dissertação objetivou avaliar o efeito de tratamento com dexametasona (0,5 mg / kg, v.o.) sobre camundongos em protocolo de suspensão das patas traseiras por 14 dias. Camundongos tiveram peso acompanhado durante o tratamento e, ao final do protocolo, animais passaram pelo teste do nado forçado para avaliação de capacidade ao exercício; tiveram sangue coletado para análise bioquímica; amostras de músculos, fígado e de osso foram obtidas para análise histológica; e, gordura para avaliação da composição corporal. Variáveis bioquímicas e biomecânicas também foram comparadas à performance do teste físico. Animais em suspensão apresentaram perda de peso, massa magra e gordura, enquanto animais em corticoterapia perderam massa magra, mas aumentaram massa gorda. Corticoterapia causou hiperglicemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e redução da lipoproteína de alta densidade. Suspensão gerou hiperglicemia e hipotrigliceridemia. Ambos apresentaram alteração de marcadores de dano hepático, porém apenas suspensão apresentou hiperbilirrubinemia. Animais que passaram pela associação tenderam a apresentar alterações parecidas com o grupo suspensão e todos os grupos de tratamento causaram degeneração gordurosa ao fígado. No entanto, a glicemia destes animais foi a mais alta, 74 % maior que o grupo controle e 24,4 % maior que corticoterapia e suspensão separadas. Para as variáveis biomecânicas, ambas situações causaram redução da área cortical do osso tibia e geraram atrofia muscular, porém suspensão danificou mais músculos. Animais da associação também apresentaram osteopenia, e, sarcopenia foi encontrada nos músculos gastrocnemio e tibial anterior, mas a associação apresentou efeito protetor no músculo sóleo. O tempo de performance no teste de nado de camundongos dos grupos suspensão e corticoterapia, separados, foi reduzido em 60 %. Camundongos no grupo de associação tiveram redução de 95 %. As variáveis bioquímicas referentes ao dano hepático e à glicemia foram inversamente relacionadas com a performance no teste. Assim, este estudo evidenciou que a associação de corticoterapia à situação de repouso absoluto causa dano musculoesquelético, porém alterações da glicemia e na capacidade ao

exercício são mais sensíveis, mostrando rapidamente o sinergismo deletério causado.

Palavras-chave: Corticoterapia; Imobilismo; Sequela.

ABSTRACT

Unloading and corticotherapy, separately, affect the musculoskeletal system and modify energetic metabolism. It is expected that this association potentiates side effects, but there is no study reporting this evaluation yet. Thus, this dissertation aimed to evaluate the effect of treatment with dexamethasone (0.5 mg / kg, v.o.) in mice under a hindlimb suspension protocol of 14 days. Body weight was tracked during treatment. At the end, animals performed the swim-forced test to analyze exercise capacity; blood was collected for biochemical analysis; samples of muscles, liver and bone were obtained for histology evaluation; and, fat collected to compare body composition. Biochemical and biomechanical data was also related to swim-forced test performance. Suspension animals showed reduction in body weight, lean mass and fat while corticotherapy animals lost lean mass, but gained fat. Corticotherapy caused hyperglycemia, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia and reduction of high-density lipoprotein. Unloading caused hyperglycemia and hypotriglyceridemia. Both corticotherapy and unloading dealt alteration of liver damage biomarkers, and liver histology evidenced fat accumulation though suspension was the only group with hyperbilirubinemia. Animals through association tended to biochemical alterations similar to suspension rather than corticotherapy. However, glycemia was 74 % higher in these animals than control, and 24.4 % higher than corticotherapy and suspension, individually. For biomechanical analysis, both models caused muscle and bone atrophy, but muscle damage caused by unloading was higher than corticotherapy's. Association also caused osteopenia, and sarcopenia was found in gastrocnemius and tibialis anterior, but corticotherapy protected soleus' atrophy during unloading. Swimming time of unloading and corticotherapy were 60 % lower than control. Mice in group of association had 95% of reduction comparing to control. Biochemical data related to hepatic injury and glycemia were inversely related to swim performance. Therefore, this study evidenced that corticotherapy associated with unloading causes musculoskeletal damage, but glycemia and physical function are more sensitive, and indicate potentiation of impairment faster.

Key-words: Corticotherapy; Unloading; Sequela.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Os componentes de um ser humano	15
Figura 2 - Sistemas biológicos de um indivíduo	17
Figura 3 - Divisão anatômica de um músculo estriado esquelético.....	19
Figura 4 - Sinalização do equilíbrio protéico de músculos	20
Figura 5 - Comparação entre perna sadia e perna imobilizada.....	22
Figura 6 - Representação do teste do nado forçado	23
Figura 7 - Internamento hospitalar: alto risco de restrição ao leito	24
Figura 8 - Suspensão das patas traseiras.....	25
Figura 9 - Sinalização de sarcopenia e osteopenia geradas pelos glicocorticoides	26

LISTA DE TABELAS

Fundamentação Teórica

Tabela 1 – Tipos de fibra muscular	19
Tabela 2 – Causas dos principais efeitos colaterais dos corticosteroides	26

Artigo

Tabela 1 – Gordura e músculo de camundongos em corticoterapia e suspensão	43
Tabela 2 – Bioquímica de camundongos em corticoterapia e suspensão.....	43
Tabela 2 – Correlações de parâmetros bioquímicos com o nado forçado	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	O CORPO HUMANO.....	16
2.2	SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	17
2.3	SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO	18
2.4	MÚSCULOS	18
2.5	ATROFIA POR DESUSO	21
2.6	IMOBILISMO NO INTERNAMENTO	23
2.7	MEDICAÇÃO.....	26
2.8	CORTICOTERAPIA.....	26
2.9	SEQUELAS DO INTERNAMENTO	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	ARTIGO - POTENCIALIZAÇÃO DE EFEITOS COLATERAIS EM MODELO DE ATROFIA POR DESUSO DECORRENTE DE CORTICOTERAPIA.....	30
5	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46
	APÊNDICE A – RESUMO 1 APRESENTADO NO VIII SINATER	54
	APÊNDICE B – RESUMO 2 APRESENTADO NO VIII SINATER	55
	APÊNDICE C – RESUMO APRESENTADO NA 47ª REUNIÃO ANUAL DA SBBQ.....	56
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	57
	ANEXO B – NORMAS DA REVISTA.....	58

1 INTRODUÇÃO

O uso de medicamentos associado ao repouso é uma forma comum de tratamento para diversas patologias (SHAH; GOREGAONKAR, 2016; SILVA JUNIOR, 2016). Em algumas doenças, esta medida é a mais utilizada e/ou a que mais traz benefícios do tratamento. No Brasil, há uma média de 11 milhões de internações anualmente. Destas internações, cerca de 3,5 milhões precisam de repouso associado à medicação com uma estimativa de 13 dias de internamento (BRASIL, 2010).

Desta população, uma grande parte necessita de tratamento com corticosteroides (GOTO et al., 2016; SHAH; GOREGAONKAR, 2016; SILVA JUNIOR, 2016), como ocorre com muitos indivíduos portadores de doenças reumatológicas crônicas em agudização (CAULEY et al., 2011; KO et al., 2016). Apesar de seus benefícios, já foi comprovado que o repouso prolongado reduz a atividade muscular e isto gera alterações na composição muscular e desencadeia alterações sistêmicas como resistência à insulina e alterações cardiovasculares (ENGLISH; PADDON-JONES, 2010; MIOKOVIC et al., 2014; MAGALHÃES et al., 2015). Além disso, o uso de corticosteroides é amplamente conhecido pelos seus efeitos colaterais sistêmicos que afetam a massa óssea, músculos e promovem distúrbio metabólico (SHAH; GOREGAONKAR, 2016).

Efeitos colaterais dos componentes desta associação, separadamente, já são de alta gravidade para os indivíduos que as utilizam (JESUS et al., 2016). O repouso já foi reportado como causa de aumento nos dias de internamento e sua duração está associada ao tempo de recuperação, sendo necessário acompanhamento fisioterapêutico e de outros profissionais de saúde (UNIC, 2009; ENGLISH; PADDON-JONES, 2010; CAULEY et al., 2011). Os corticosteroides, por sua vez, também geram risco de fraturas por osteoporose e aumentam a possibilidade de infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (SHAH; GOREGAONKAR, 2016).

O repouso e a medicação com corticosteroides geram um gasto extra de até milhares de reais aos pacientes, além do risco de morte, porém o uso desta associação é vastamente utilizado e validado para o tratamento de muitos pacientes (UNIC, 2009; CAULEY et al., 2011; MIOKOVIC et al., 2014; LLORET et al., 2016). Muito se sabe sobre os efeitos colaterais, separadamente, mas não há estudos que avaliem os efeitos desta combinação. Deste modo, esta dissertação teve como objetivo avaliar as alterações

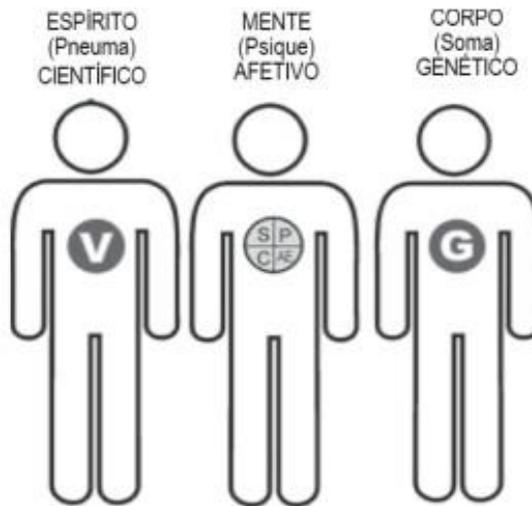
musculoesqueléticas e bioquímicas causadas pela associação do repouso ao uso de fármacos corticosteroides em modelo animal.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O CORPO HUMANO

O ser humano, assim como qualquer ser vivo complexo, possui grande rede de reações físicoquímicas sustentadas por estruturas anatômicas, que foram aprimoradas ao longo da evolução do *Homo sapiens* para sua sobrevivência (BAERTSCHI, 2014). Apesar de suas maiores características serem primordialmente biológicas, a Organização Mundial de Saúde reconhece que não só o bem-estar físico mantém a saúde humana, mas também o mental e social (OMS, 1948).

Figura 1 - Os componentes de um ser humano.



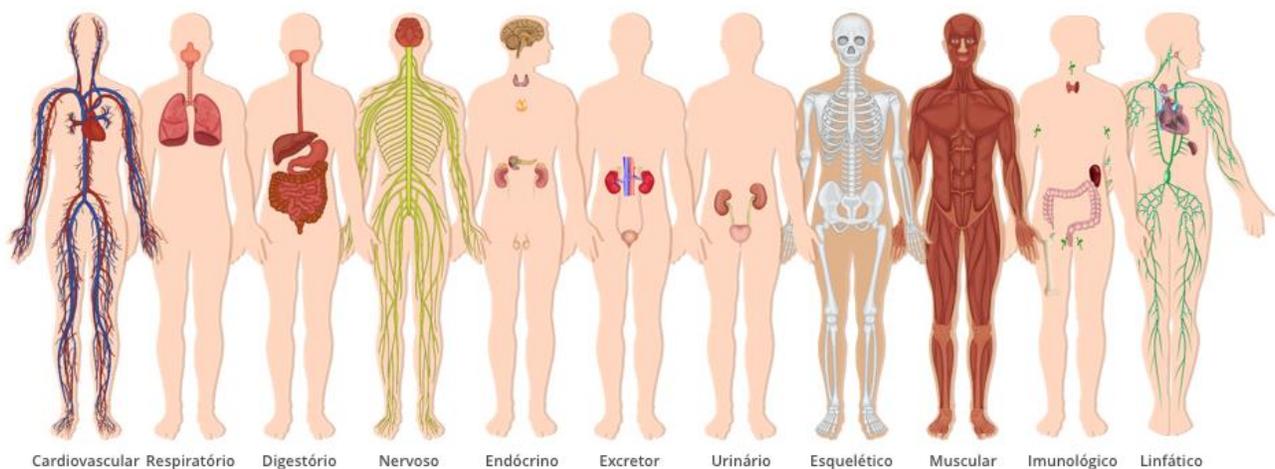
Fonte: Helena, 2015.

Recentemente, também houve a adição da espiritualidade como componente de um indivíduo e a necessidade de seu equilíbrio para que um ser esteja em gozo de sua saúde (OMS, 2018). No entanto, a dificuldade de avaliar condições espirituais e até mesmo sociais restringem as ciências que estudam o ser humano em detalhar primordialmente os fenômenos biológicos, relacionados aos sistemas orgânicos que mantêm o corpo humano funcionando (LEGARE et al., 2018; LIU, 2018).

2.2 SISTEMAS BIOLÓGICOS

Em termos anatômicos e fisiológicos, além da didática separação em tecidos e órgãos, o corpo humano é, na verdade, a junção de diversos sistemas biológicos. Estes sistemas, por sua vez, são formados por células especializadas, formadoras de órgãos específicos de cada sistema, mas que trabalham em conjunto, a partir de sinalizações e respostas para a manutenção do funcionamento de um ser vivo (CREAGER, 2018). Dentre os principais sistemas, destacam-se: cardiovascular, respiratório, nervoso e digestivo (MARTINI et al., 2013). Contudo, alterações genéticas, o estilo de vida e traumas podem alterar o funcionamento de um ou mais sistemas. Isto causa dificuldade na realização de tarefas do cotidiano do indivíduo e pode levar à morte precoce (BACK NETTO, et al., 2018; ZHOU et al., 2018).

Figura 2 - Sistemas Biológicos de um indivíduo.



Fonte: Todamateria, 2018.

Alguns sistemas não conseguem sinalizar mal funcionamento com facilidade; como ocorre com os sistemas cardiovascular e digestivo, que podem suportar aneurismas e dificuldade na absorção de nutrientes por meses, ou mesmo anos, até que sejam diagnosticados (ALI et al., 2018; PATEL et al., 2018). Por outro lado, os sistemas nervoso e musculoesquelético conseguem rapidamente indicar disfunção e falha. O sistema musculoesquelético, em específico, consegue indicar rapidamente alterações de sua

massa, bem como sinalizar fraqueza e redução da independência funcional em resposta à alteração do metabolismo protéico e/ou da condução nervosa (LOCQUET, 2018).

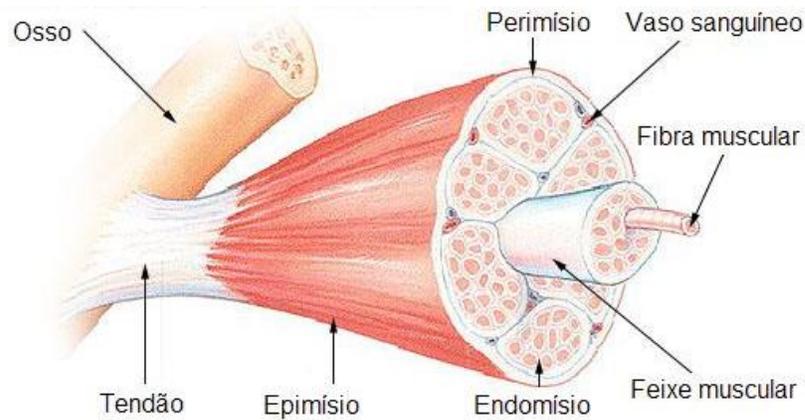
2.3 SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO

"Movimento" é a primeira palavra que vem a cabeça de qualquer pessoa ao pensar em sistema musculoesquelético. Esta característica é oriunda da junção de músculos, ossos e articulações (FEDORUK; HONG, 2014). O sistema responsável por dar movimentação ao corpo humano é, inicialmente, responsável por garantir a movimentação do indivíduo em situações de luta, fuga e sobrevivência. No ser humano moderno, o sistema musculoesquelético garante sua funcionalidade. Desde atividades de higiene e alimentação a habilidades para realizar funções específicas de determinado trabalho (exemplo: digitação, marcenaria e artesanato). Por meio da ação muscular, há a movimentação de ossos e partes moles, e isso é o que leva os músculos a serem as peças-chaves para a movimentação. A musculatura, maior representante, ainda, ajuda a proteger o corpo de traumas e combater o frio e isto não ocorre somente aos humanos, mas também aos demais animais (GUIMARÃES et al., 2015).

2.4 MÚSCULOS

Músculos são agrupamentos de feixes musculares formados por fibras musculares e miócitos. Em um organismo, encontram-se mais de 600 músculos e estes representam 35% a 65% do peso corporal (FEDORUK; HONG, 2014). Tecido conjuntivo recobre as fibras individualmente, formando o endomísio, que por sua vez se agrupa e é recoberto por outra camada de tecido conjuntivo e forma o perimísio. À unidade coberta pelo perimísio se dá a denominação de fascículo e o agrupamento destes é recoberto pelo epimísio e forma o músculo. Para fixação, tendões se encontram a cada extremidade do músculo, que se fixa em ossos na maioria das vezes, mas pode também se fixar em outros músculos ou estruturas articulares (GUIMARÃES et al., 2015; POZZOBON; PEREIRA; JUNG, 2015).

Figure 3 - Divisão anatômica de um músculo estriado esquelético.



Fonte: Schmidt, 2018.

Existem dois grandes grupos de músculos, que se dividem quanto à sua capacidade ao exercício e metabolismo: os músculos brancos e os músculos vermelhos. De forma geral, os músculos sempre possuem ambos os tipos de fibras (vermelhas e brancas), porém alguns podem apresentar maior quantidade de uma ou de outra devido ao local onde se encontra ou à demanda de exercício requisitada (SHORTREED et al., 2009).

Tabela 1. Tipos de fibra muscular.

Propriedade	Fibra Branca	Fibra Intermediária	Fibra Vermelha
Denominação	Tipo IIb	Tipo IIa	Tipo I
Concentração de Mioglobina	Baixa	Alta	Alta
Metabolismo Predominante	Glicolítico	Glicolítico/Oxidativo	Oxidativo
Quantidade de Mitocôndrias	Baixa	Intermediária	Alta
Diâmetro	Grande	Pequeno/Intermediário	Pequeno
Velocidade de Contração	Rápida	Rápida	Lenta
Tipo de Contração	Fásica	Tônica	Tônica

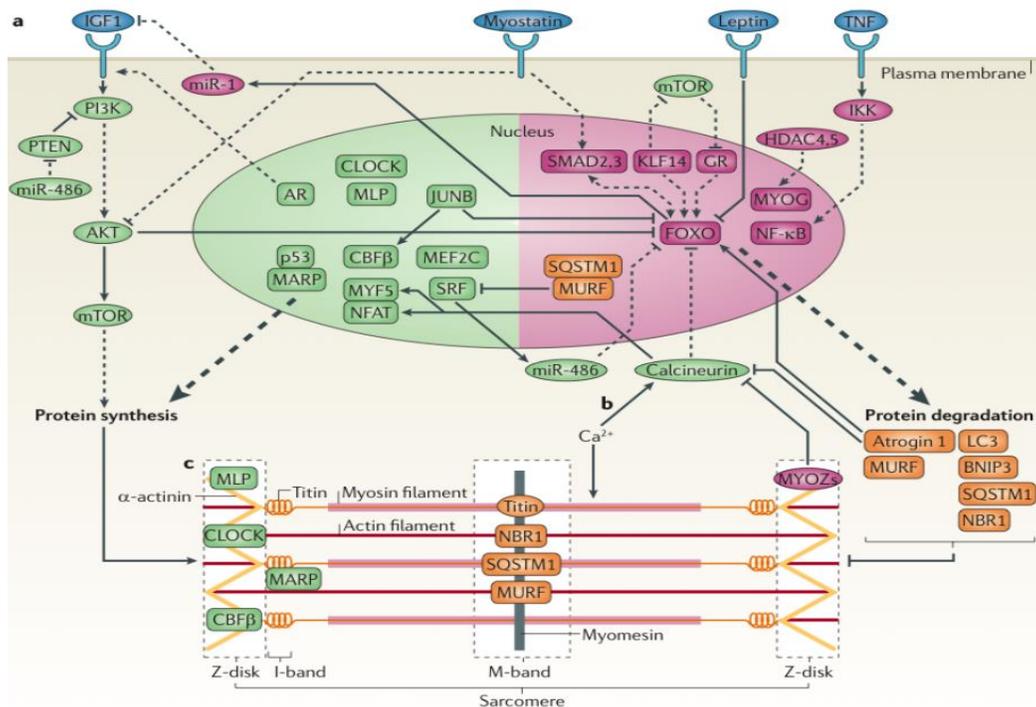
Fonte: Adaptado de Guimarães e Adell (1995).

As fibras denominadas vermelhas recebem este nome devido ao maior conteúdo de mioglobina, da mesma forma que as que possuem menor quantidade são denominadas de brancas. Há ainda uma terceira classe de fibras, que é denominada intermediária, por possuir propriedades de ambas (GITLER et al., 2017). Além da coloração, as fibras divergem na demanda de lipídeos e glicogênio para obtenção de energia, número de mitocôndrias, vascularização e tamanho de fibra. As fibras vermelhas são mais oxidativas

e respondem melhor a exercícios de resistência; as fibras brancas possuem alta atividade glicolítica, porém fadigam em poucos minutos; enquanto as fibras intermediárias conseguem energia em ambas vias metabólicas e possuem um tempo moderado para chegar à fadiga (GUIMARÃES; ADELL, 1995; SHORTREED et al., 2009).

Para um bom funcionamento muscular, o músculo precisa de boa irrigação sanguínea, inervação e frequente atividade. Assim, o balanço das vias que sintetizam proteínas musculares e as que degradam se encontram em equilíbrio. Até então, várias vias já são reportadas como agentes estabilizadores da massa muscular. Dentre as mais estudadas estão: 1) AKT - mTOR, responsável por sintetizar proteínas; 2) AKT - FOXO, responsável por inibir genes de degradação de proteínas; 3) Calcineurina - NFAT, ativadora de síntese proteica; e, 4) Miostatina, inibidora de síntese proteica e ativadora de degradação proteica. Estas vias estão diretamente relacionadas com o metabolismo da insulina/glicose, níveis circulantes de hormônios sexuais, mediadores inflamatórios e atividade física (TIERNEY et al., 2014; MASHINCHIAN et al., 2017; ZHAO et al., 2018).

Figura 4 - Sinalização do equilíbrio protéico de músculos.



Fonte: Tierney et al. (2014).

Treinamento muscular ou aumento da demanda de atividade são necessários para garantir a saúde do tecido muscular, pois o treino ajuda a melhorar a vascularização e inervação, bem como consegue gerar hipertrofia muscular, aumento de força e resistência,

além de beneficiar outros sistemas (prevenindo e/ou tratando afecções) (HUANG et al., 2016). No entanto, ainda há maior número de pessoas sedentárias do que ativas no mundo apesar do exercício potencializar tratamentos, reduzir pela metade o tempo de hospitalização e a taxa de mortalidade. O exercício, ainda, melhora a qualidade de vida de seres humanos acometidos por alguma patologia, além de conseguir melhorar a qualidade de vida de pessoas sem distúrbios na saúde. Outrossim, a falta de treino muscular pode causar redução progressiva da massa muscular e/ou da qualidade muscular, pois músculos pouco funcionantes tendem a acumular gordura e gerar processos inflamatórios crônicos (SHORTREED et al., 2009).

2.5 ATROFIA POR DESUSO

Redução de atividade muscular está diretamente relacionada com redução da qualidade de vida, complicação de doenças e morte. Assim, surgiu o termo atrofia por desuso, que caracteriza a forma mais comum de atrofia muscular depois da atrofia visualizada na senescência. Quando um músculo está funcionando e com boa demanda de atividade, sua massa se encontra em padrões regulares para a idade e sexo do indivíduo. Pessoas que possuem hábitos de vida sedentários tendem a desenvolver problemas biomecânicos, como encurtamento muscular e rigidez articular (REN; QIAN; REN, 2014; MASSOD et al., 2015). A diminuição da atividade muscular associada às alterações biomecânicas leva o músculo a perder equilíbrio do anabolismo e catabolismo protéico por redução da sinalização que sintetiza proteínas musculares e aumento das vias de degradação (FERREIRA et al., 2004).

A redução da massa muscular, por sua vez, altera vias metabólicas, o que causa distúrbios sistêmicos. Estudos mostram que a atrofia leva a redução da quantidade de receptores de insulina, bem como de sua afinidade pelo substrato. Esta situação gera Diabetes tipo II e produtos da glicoxidação avançada devido à hiperglicemia, o que desencadeia processo inflamatório crônico e maior aumento do desequilíbrio protéico. Além do mais, há aumento do metabolismo de lipídeos, causando hiperatividade hepática seguida de degeneração gordurosa, levando o indivíduo à inflamação crônica oriunda da oxidação lipídica (NORTON; DEFRONZO, 2014).

Figura 5 - Comparação entre perna sadia e perna imobilizada.



Fonte: FaçaFisioterapia, 2018.

Ademais das variáveis bioquímicas, o imobilismo pode ser analisado pela quantificação da massa muscular ou análises de seu funcionamento (FERREIRA et al., 2004). Existem formas de avaliação que conseguem dar graus e quantificar a perda muscular. As técnicas variam de questionários sobre dificuldade na realização de atividades a técnicas mais invasivas, como biopsia muscular. Em modelos animais de atrofia por desuso, existem: a biopsia para quantificação da área de secção transversa, que está relacionada com a força muscular; a dinamometria isocinética, que consegue avaliar a capacidade de contração máxima e fadiga de um músculo; e, o teste do nado forçado, que avalia de forma menos precisa a capacidade funcional do animal ao exercício. (FERREIRA et al., 2004; ALWAY et al., 2014)

A menor precisão do teste do nado forçado é compensada por ser um teste não invasivo. O animal tem de cinco a dez por cento do peso corporal adicionado ao tronco por meio de objetos de vidro ou metal e é colocado em um compartimento com água até que sua cauda não alcance o fundo (HUANG et al., 2012; XU et al., 2013). Então, é observado o tempo que o animal consegue passar nadando sem afundar por mais de seis segundos. Espera-se que o animal consiga passar um tempo maior que trinta minutos, assim quanto mais tempo passar, mais preparo físico o animal possui (WANG et al., 2012).

Figura 6 - Representação do teste do nado forçado.



Fonte: WikimediaCommons, 2014.

Da mesma forma que animais possuem testes físicos não invasivos, que são mais eficientes que questionários e escalas, seres humanos possuem testes de força para cada músculo ou grupamento muscular e testes funcionais, como o *timed up and go* (Tempo para levantar e ir) (MARTINEZ et al., 2016). Este teste ajuda a identificar redução da capacidade funcional de indivíduos e está relacionado com redução da função, risco de quedas e morbimortalidade. Outrossim, estudos evidenciam que apesar da população apresentar certo grau de redução das propriedades do sistema musculoesquelético devido ao sedentarismo, aqueles que passam por períodos de imobilização ou repouso absoluto são os mais acometidos e apresentam sequelas após o internamento (MARTINEZ et al., 2016; RODRIGUES; SOUZA, 2016).

2.6 IMOBILISMO NO INTERNAMENTO

Repouso de enfermos para ajudar na recuperação é uma atividade que ocorre desde as primeiras civilizações. Imobilismo é a denominação dada às situações em que a movimentação do corpo é reduzida à máxima nulidade de movimentos corporais ativos (PARK et al., 2018). Esta situação é muito comum em idosos que possuem pouca

assistência, pacientes hospitalizados por longos períodos e pacientes em unidades de terapia intensiva (REIDY et al., 2018). Assim como visto em indivíduos sedentários, a completa cessação de movimentos leva a severa atrofia por desuso, só que, por já se encontrarem em situação mais delicada, o imobilismo reduz a expectativa de vida de idosos e aumenta a morbimortalidade de pacientes internados (PEREIRA et al., 2017).

Figura 7. Internamento hospitalar: alto risco de restrição ao leito.



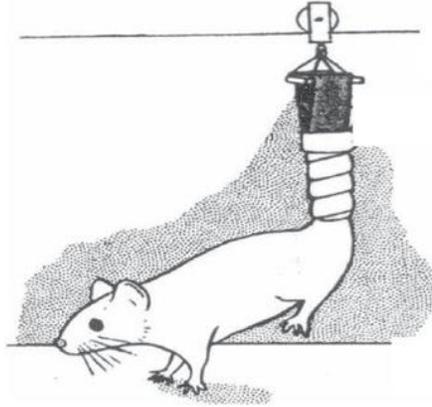
Fonte: Instituto Português de Reumatologia, 2018.

Em experimentação, existem modelos com animais que simulam a situação para melhor investigar formas de combater as sequelas do imobilismo. Dentre elas, o modelo de suspensão das patas traseiras é um modelo bastante utilizado em várias partes do mundo. Criado por pesquisadores da Administração Nacional da Aeronáutica e Espaço dos Estados Unidos da América (NASA), este modelo inicialmente foi utilizado para mimetizar a redução das forças gravitacionais, ajudando a investigar medidas que reduzissem danos aos tripulantes de viagens espaciais. No entanto, o modelo é difundido por grupos de pesquisa por conseguir gerar alterações sistêmicas encontradas em pacientes acamados (SHIMANO; VOLPON, 2007; ALWAY et al., 2014).

O protocolo se dá pela suspensão do animal pela cauda ou por cinta pélvica. Seu corpo é suspenso até formar 30° de elevação do chão. Assim, o animal tem redução da atividade física corporal e os efeitos gerados pela gravidade se reduzem significativamente. É importante que a gaiola seja adaptada, para que o animal consiga se locomover e alimentar-se, reduzindo o estresse causado pela suspensão. Porém, é

reportado redução do consumo alimentar, dificuldade para urinar e perda de pêlos (BARBOSA et al., 2011; ALWAY et al., 2014).

Figura 8 - Suspensão das patas traseiras.



Fonte: Barbosa et al, 2011.

Modelos experimentais são de grande relevância para esta condição, pois trabalhos com pacientes acamados são muito delicados e colocam a vida dos participantes em risco (ALWAY et al., 2014). A sinalização molecular gerada age bloqueando as vias de síntese proteica e ativando as de degradação de proteínas musculares, mas alterações cardiovasculares, respiratórias e endócrinas também são reportadas (SHIMANO; VOLPON, 2007; BARBOSA et al., 2011; ALWAY et al., 2014). Das principais sequelas geradas, a redução da massa muscular é a mais grave, pois é a alteração mais relacionada com os principais desfechos do paciente (perfil funcional, qualidade de vida e tempo de sobrevivência) (PARK et al., 2018).

Ademais, estudos sobre os efeitos do imobilismo são importantes, pois os sobreviventes de longos períodos de internamento perdem a capacidade de realizar atividades de vida diária e do trabalho. Assim, reduzem as relações sociais e produtividade econômica, além de se tornarem dependentes. Isto leva a gastos exorbitantes com assistência no domicílio e reabilitação. Atualmente, medicações e fisioterapia são investidas nestes pacientes no intuito de reduzir os efeitos deletérios do imobilismo, porém só a fisioterapia consegue evidenciar benefícios a partir de recursos como a mobilização precoce (SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2014). Ainda é escassa a literatura que comprove benefícios de medicamentos para redução dos efeitos do repouso absoluto.

2.7 MEDICAÇÃO

Medicamentos são produtos farmacêuticos tecnicamente obtidos para tratamento ou diagnóstico de doenças. Em pacientes internados, são utilizados para combater doenças de base e reduzir efeitos colaterais do tratamento (LIRA et al., 2014). A maioria dos remédios atacam o funcionamento dos rins e/ou fígado, por serem os locais responsáveis pela metabolização dos fármacos (LEITE; VIEIRA; VEBER, 2008). Dos medicamentos que são utilizados para suprir efeitos colaterais do tratamento e tratar doenças de base, se destacam os corticosteróides por sua potente ação antiinflamatória e imunossupressora (KLEIN, 2015).

2.8 CORTICOTERAPIA

Glicocorticosteroides são drogas com alto poder antiinflamatório e imunossupressor devido à sua capacidade de atravessar a membrana celular e agir diretamente no núcleo, alterando a velocidade de síntese proteica e reduzindo a liberação de fosfolipídeos encontrados na membrana (ANTI; GIORGI; CHAHADE, 2008). De origem sintética, esta classe farmacológica foi criada após a descoberta do glicorticoide, cortisol, produzido na área cortical da glândula adrenal e que possui papel importante no metabolismo das macromoléculas e atua como antiinflamatório e imunossupressor endógeno. Apesar de seus benefícios, os corticoides geram diversos efeitos colaterais, pois conseguem interagir com quase todas as células do organismo (ALHEIRA; BRASIL, 2005).

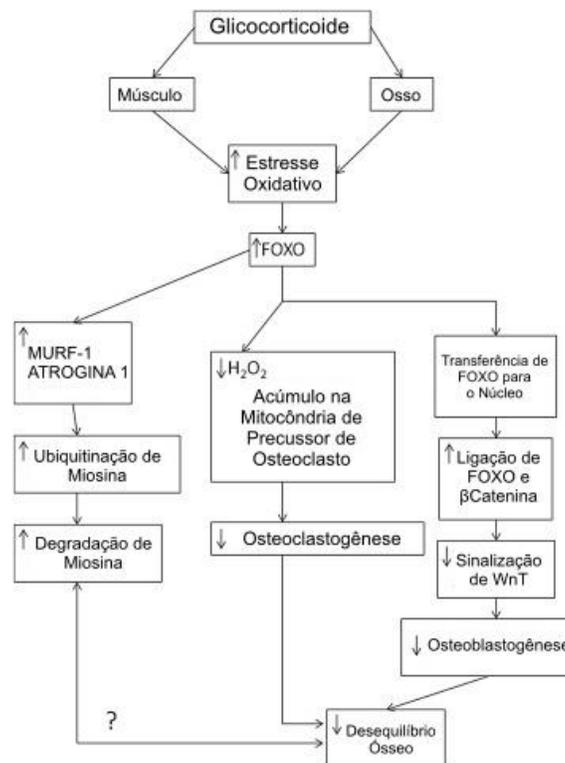
Tabela 2 - Causas dos principais efeitos colaterais dos corticosteroides.

Efeito Colateral	Causa
Redução do crescimento (em crianças)	calcificação precoce da placa epifisária
Osteoporose	liberação de íons de Cálcio
Aumento do apetite e Distúrbios emocionais	alteração na liberação de neurotransmissores
Hipertensão	acúmulo de gordura nos vasos
Glaucoma	aumento da pressão intraocular
Dificuldade de cicatrização	imunossupressão e redução de sinalizadores inflamatórios
Aumento de gordura centrípeta	aumento do metabolismo lipídico
Úlceras pepticas	alteração do pH gástrico

Fonte: Adaptado de Anti; Giorgi; Chahade (2008), Nicastro (2009) e Klein (2015).

A interação dos corticostetoides sintéticos com o organismo gera distúrbio do metabolismo e alteração nas funções de grandes sistemas como nervoso, cardiovascular e musculoesquelético (ANTI; GIORGI; CHAHADE, 2008). Corticosteroides causam alteração do balanço eletrolítico e isso leva à liberação do cálcio concentrado em ossos, causando osteoporose (KLEIN, 2015). Alterações do metabolismo de glicose e lipídeos gera resistência à insulina e causa diabetes medicamentosa, que pode se estender após o término do tratamento. Estas alterações metabólicas, ainda, geram aumento inicial da função hepática para dar conta da alta demanda de lipídeos, mas segue com processo inflamatório e acúmulo de gordura nos hepatócitos, gerando morte celular e disfunção hepática. Os vasos sanguíneos sofrem acúmulo de gordura causada pelo aumento do colesterol circulante, podendo gerar tromboembolias; e, os músculos sofrem aumento da sinalização de degradação proteica e inibição da síntese, além da resistência a insulina aumentar o desequilíbrio proteico e causar atrofia das fibras musculares (NICASTRO, 2009; KLEIN, 2015).

Figura 9 - Sinalização de sarcopenia e osteopenia geradas pelos glicocorticoides.



Fonte: Adaptado de Klein (2015).

Estes distúrbios são encontrados em pacientes portadores de inflamação crônica, pois utilizam comprimidos de glicocorticoides por longos anos. No entanto, a administração de aerossóis e a utilização de pomadas com corticoides na posologia também pode causar estes efeitos sistêmicos (PRATS et al., 2012). A resposta sistêmica se dá pela facilidade de transporte dos esteroides pelas membranas celulares. Ademais, doses altas em curtos períodos também podem desencadear prejuízos no metabolismo, que podem durar após o tratamento (SANTOS, 2007).

2.9 SEQUELAS DO INTERNAMENTO

Durante o internamento, os longos períodos acamados e as administrações de diversas drogas causam efeitos deletérios sistêmicos (PARK et al., 2018). O sistema musculoesquelético é o mais acometido e isso acarreta diretamente na perda de função e redução da expectativa de vida de sobreviventes (REIDY et al., 2018). Estudos mostram que 50% dos pacientes internados em unidade de terapia intensiva evoluem com alteração neuromuscular, maior chance de óbito durante o internamento e maior necessidade de reabilitação após a alta (DANTAS et al., 2012; PEREIRA et al., 2017). Além disto, as medicações podem também afetar órgãos importantes para a saúde humana e potencializar os efeitos negativos sobre o sistema musculoesquelético (PRATS et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações causadas por um protocolo de atrofia por desuso associado ao uso de corticosteroide.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar alterações de peso e composição corporal de camundongos submetidos à suspensão das patas traseiras sob corticoterapia
- b) Avaliar condicionamento físico após protocolo de desuso associado à corticoterapia;
- c) Determinar concentrações plasmáticas de macromoléculas do metabolismo energético destes camundongos;
- d) Investigar dano hepático;
- e) Analisar dano muscular e ósseo;
- f) Relacionar dano funcional à alterações bioquímicas e biomecânicas.

4 ARTIGO

POTENCIALIZAÇÃO DE EFEITOS COLATERAIS EM MODELO DE ATROFIA POR DESUSO DECORRENTE DE CORTICOTERAPIA



Proposta de submissão à Revista
Brazilian Journal of Medical and Biological Research
Fator de Impacto: 1.578
Qualis CAPES: Ciências Biológicas II - A2

POTENCIALIZAÇÃO DE EFEITOS COLATERAIS EM MODELO DE ATROFIA POR DESUSO DECORRENTE DE CORTICOTERAPIA

J.R.S. Oliveira¹, V.C.O. Carvalho¹, P.L. Medeiros², C.S.M. Fonseca¹, V.L.M. Lima¹.

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

²Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

Correspondência:

V.L.M. Lima:

Laboratório de Lipídeos e Aplicações de Biomoléculas em Doenças Prevalentes e Negligenciadas, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

Avenida Professor Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, 50670420. Recife, PE, Brazil.

<vlml@ufpe.br>

Resumo

Imobilização e corticoterapia, separadamente, afetam o sistema musculoesquelético e causam alteração do metabolismo energético. Espera-se que a associação destas potencialize os danos, mas não há estudos que quantifiquem este prejuízo. Deste modo, esta dissertação objetivou avaliar o efeito de tratamento com dexametasona (0,5 mg / kg, v.o.) sobre camundongos em protocolo de suspensão das patas traseiras por 14 dias. Camundongos tiveram peso acompanhado durante o tratamento e, ao final do protocolo, animais passaram pelo teste do nado forçado para avaliação de capacidade ao exercício; tiveram sangue coletado para análise bioquímica; amostras de músculos, fígado e de osso foram obtidas para análise histológica; e, gordura para avaliação da composição corporal. Variáveis bioquímicas e biomecânicas também foram comparadas à performance do teste físico. Animais em suspensão apresentaram perda de peso, massa magra e gordura, enquanto animais em corticoterapia perderam massa magra, mas aumentaram massa gorda. Corticoterapia causou hiperglicemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e redução da lipoproteína de alta densidade. Suspensão gerou hiperglicemia e hipotrigliceridemia. Ambos apresentaram alteração de marcadores de dano hepático, porém apenas suspensão apresentou hiperbilirrubinemia. Animais que passaram pela associação tenderam a apresentar alterações parecidas com o grupo suspensão e todos os grupos de tratamento causaram degeneração gordurosa ao fígado. No entanto, a glicemia destes animais foi a mais alta, 74 % maior que o grupo controle e 24,4 % maior que corticoterapia e suspensão separadas. Para as variáveis biomecânicas, ambas situações causaram redução da área cortical do osso tíbia e geraram atrofia muscular, porém suspensão danificou mais músculos. Animais da associação também apresentaram osteopenia, e, sacorpenia foi encontrada nos músculos gastrocnêmio e tibial anterior, mas a associação apresentou efeito protetor no músculo sóleo. O tempo de performance no teste de nado de camundongos dos grupos suspensão e corticoterapia, separados, foi reduzido em 60 %. Camundongos no grupo de associação tiveram redução de 95 %. As variáveis bioquímicas referentes ao dano hepático e à glicemia foram inversamente relacionadas com a performance no teste. Assim, este estudo evidenciou que a associação de corticoterapia à situação de repouso absoluto causa dano musculoesquelético, porém

alterações da glicemia e na capacidade ao exercício são mais sensíveis, mostrando rapidamente o sinergismo deletério causado.

Palavras-chave: Dexametasona, Suspensão da pata traseira, Glicemia, Atrofia muscular, Resistência.

Introdução

O repouso na cama é uma alternativa para manter o paciente em repouso durante o tratamento e cura de algumas doenças (1,2). No entanto, essa situação acarreta distúrbios musculoesqueléticos, sendo a atrofia por desuso a principal consequência (3). No Brasil, cerca de 3,5 milhões de pacientes necessitam de repouso absoluto, e sua permanência no hospital dura cerca de 13 dias (4), o que é suficiente para gerar perda muscular e alterações sistêmicas (5).

A maioria desses pacientes é tratada com algum corticosteroide (1,2,6), embora os pacientes crônicos sejam os principais usuários (7). Os corticosteroides são medicamentos antiinflamatórios potentes usados para potencializar o tratamento, mas podem causar acúmulo de gordura, disfunção musculoesquelética e maior risco de doenças cardiovasculares devido à sua alteração no metabolismo lipídico (8,9).

Além disso, após a internação, o paciente necessita de reabilitação multidisciplinar devido às sequelas metabólicas, biomecânicas e funcionais, (5) e os custos podem superar a internação (5,10). Sabe-se que o repouso no leito e a corticoterapia, isoladamente, podem causar danos musculares e disfunções sistêmicas. Além disso, presume-se que essa combinação possa potencializar os efeitos colaterais da hospitalização, devido às suas diferentes vias para causar disfunção (11). No entanto, não há estudos com o objetivo de verificar os efeitos colaterais dessa combinação. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a disfunção musculoesquelética e energética causada por descarga associada à corticoterapia em modelo de camundongo.

Materiais e Métodos

Animais e Ética

Este estudo teve aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), processo número 0008/2017. O Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE disponibilizou 48 camundongos machos, albinos

suíços, para os experimentos. Os animais foram alojados no Departamento de Bioquímica - UFPE por uma semana antes do protocolo; ali, os animais foram enjaulados individualmente, com água e ração ad libitum, sob temperatura e umidade controladas em um ciclo de 12h / 12h de claro e escuro.

Desenho do Estudo

Os animais foram divididos em quatro grupos: 1 - Controle: animais alojados individualmente em gaiolas regulares recebendo 100µL de água (v.o.) diariamente; 2 - HLS: animais suspensos por seus contos em gaiolas adaptadas de forma que seu corpo se incline 30° do chão em um protocolo de suspensão de membros posteriores conforme descrito em (3), recebendo 100µL de água (v.o.) diariamente; 3 - Dex: animais alojados individualmente em gaiolas regulares recebendo 0,5mg / kg de Dexametasona em 100µL de água (v.o.) diariamente (12); 4 - HLS + Dex: animais suspensos por seus contos em gaiolas adaptadas para que seu corpo se inclinasse 30° do chão em um protocolo de suspensão de membros posteriores recebendo 0,5mg / kg de Dexametasona em 100µL de água (v.o.) diariamente. Cada grupo teve 12 animais que foram tratados e observados durante 14 dias.

Peso Corporal e Composição

Os animais foram pesados em balança digital nos dias 1, 7 e 14. No dia 14, a gordura epididimal e os músculos gastrocnêmio, sóleo e tibial anterior foram coletados de 6 camundongos sob anestesia de cada grupo e pesados para comparação.

Dados Bioquímicos

Amostras de sangue foram retiradas do plexo retro-orbital de 6 camundongos de cada grupo. O sangue foi coletado em tubos com EDTA e posteriormente cetrifugado para obtenção do plasma. O plasma foi usado para quantificar o Colesterol Total (TC), Triglicerídeos (TG), Lipoproteína de Alta Densidade - colesterol (HDL-c), Glicose, Aspartato Transaminase (AST), Alanina Transaminase (ALT) e Bilirrubina Total com kits, LabTest (Brasil).

Avaliação Histológica

No dia 14, os camundongos que tiveram sangue coletado, ainda sob anestesia, tiveram fígado, tibia óssea, músculos gastrocnêmio, sóleo e tibial anterior removidos. Os órgãos foram fixados com tampão de formalina a 10% e, em seguida, cortes de 5 µ de espessura foram corados com hematoxilina e eosina para análise por microscopia óptica.

Amostras de fígado foram utilizadas para avaliar a hepatotoxicidade, os músculos foram analisados no software ImageJ (EUA) para a área transversal da fibra e a espessura cortical do osso foi avaliada com cinco amostras da diáfise de cada animal para verificar a perda de massa óssea no software ImageJ (EUA).

Performance Física

Seis animais que não tiveram sangue coletado de cada grupo foram designados para realizar o teste de natação forçada no final do 14^o dia conforme descrito em outro lugar (13,14). Os animais foram alojados individualmente em câmaras (altura: 35cm e diâmetro: 25cm) com água, 25°C, até o ponto em que não conseguissem atingir o fundo da câmara com a cauda. Em seguida, os camundongos foram observados até que não pudessem nadar de volta à superfície por seis segundos. Nesse momento, os animais foram retirados da câmara, secos com toalha e anotado o tempo.

Análise Estatística

ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni foi realizada para todas as comparações intergrupos, e MANOVA seguida pelo teste de Bonferonni foi usada para comparações de peso. O teste qui-quadrado foi usado para avaliar os resultados do teste de natação forçada com todas as variáveis bioquímicas e componentes corporais. $p < 0,05$ identificou diferença estatística no software GraphPad Prism, versão 7 (EUA).

Resultados

Os camundongos do grupo Dex mantiveram o peso corporal igual ao controle, conforme mostrado na Figura 1. Os animais HLS e HLS + Dex, no entanto, tiveram o peso corporal diminuído no dia 7 e permaneceram mais baixos do que o controle e Dex até o dia 14. O grupo HLS + Dex não têm a diminuição mais drástica no peso corporal, e isso sugere que a dexametasona não influencia a perda de peso durante a descarga. No entanto, Dex aumentou a gordura epididimal e reduziu a massa dos músculos gastrocnêmio e tibial anterior em comparação ao Controle (Tabela 1). Para os camundongos HLS, também houve redução na massa muscular, mas os animais perderam gordura em vez de ganhá-la. Além disso, a atrofia muscular foi mais intensa em animais HLS do que Dex. Embora os animais HLS + Dex apresentassem a menor massa tibial anterior, foi observada apenas uma tendência de redução da massa adiposa e muscular.

Os animais dos grupos HLS e Dex, separadamente, apresentaram perfil energético alterado conforme Tabela 2. No entanto, a glicemia foi a única alteração aumentada no

HLS + Dex quando comparados aos grupos HLS e Dex. Animais Dex não apresentaram alteração nos níveis de bilirrubina, mas AST e ALT aumentaram, enquanto o grupo HLS teve todos os marcadores hepáticos aumentados. HLS + Dex tinha comprometimento bioquímico semelhante ao HLS.

As Figuras 2, 3 e 4 mostram que a massa muscular do Gastrocnêmio, Tibial Anterior e Sóleo foi menor nos animais HLS do que no Controle. Os animais que receberam dexametasona tiveram redução apenas em Soleus e Gastrocnemius. HLS + Dex não aumentou o dano de massa de nenhum músculo. Para análise óssea, Dex e HLS tiveram espessura cortical mais fina do que o controle, e HLS + Dex teve a menor thickness (Figura 5). A histologia das amostras de fígado evidenciou acúmulo de gordura nos hepatócitos e células com núcleos maiores nos grupos HLS, Dex e HLS + Dex (Figura 6).

Os animais Dex apresentaram 70% menos capacidade para realizar o teste quando comparados ao Controle (Figura 7). Resultados semelhantes foram encontrados em animais HLS, que tinham 74% menos capacidade. Muito mais danos foram encontrados no grupo HLS + Dex. Esses animais tiveram a menor capacidade para realizar o teste, acima de 90 de redução. Os resultados do teste nadar forçado foram correlacionados com os níveis de ALT e AST (Tabela 3), mas a glicemia apresentou o maior resultado qui-quadrado, mostrando uma maior correlação inversa do desempenho dos camundongos e os níveis de glicose plasmática.

Discussão

Este é o primeiro estudo a avaliar as comorbidades causadas por descarga associada à corticoterapia. De modo geral, a suspensão dos membros posteriores levou os animais a perderem gordura e massa muscular, e isso está bem representado na redução drástica do peso corporal. Outros estudos comumente relatam redução da massa muscular causada pela descarga (3,5,15). Apesar disso, poucos estudos avaliam a alteração da massa gorda, pois os estudos enfocam principalmente as complicações musculares, mas essa redução pode estar relacionada à redução do consumo alimentar decorrente do estresse da suspensão (3). Para a corticoterapia, existe o senso comum de sua capacidade de induzir o acúmulo de gordura, o que parece ocultar a perda muscular que causa (8,12), mas um estudo com dosagem menor que o nosso (16) relatou perda de peso corporal. Este estudo utilizou 0,1mg / kg de dexametasona por apenas 4 dias, o que poderia gerar resistência à insulina e perda muscular, mas não foi eficiente para

desenvolver obesidade neste período. Nossos animais Dex apresentaram redução da massa muscular, mas o aumento do tecido adiposo evitou alterações no peso corporal. Além disso, o HLS + Dex também apresentou redução na massa muscular, e o tibial anterior desses camundongos teve média menor do que o HLS e o Dex separadamente. No entanto, a divergência na massa gorda de HLS e Dex restringiu o synergism para HLS + Dex. Esses animais apresentaram menor massa gorda, provavelmente, devido à redução na ingestão alimentar e na utilização de glicose.

As variáveis bioquímicas também foram divergentes para os grupos HLS e Dex. HLS reduziu TG e TC quando comparado ao controle, enquanto camundongos Dex aumentaram os níveis de lipídios. Animais Dex e HLS tiveram alteração em AST e ALT, mas apenas HLS também aumentou a bilirrubina. Isso sugere maior hepatotoxicidade em ratos de descarga. A corticoterapia é conhecida por aumentar o metabolismo lipídico (8,12), o que leva ao aumento do TG e CT séricos, mas também à redução do HDL-c para a manutenção dessa condição (9). Por outro lado, os camundongos que descarregam geralmente aumentam o gasto de lipídios devido ao metabolismo da glicose prejudicado (17,18), e comer menos do que o normal poderia justificar a redução de TG e aumento de HDL-c.

Além disso, os níveis de AST e ALT foram maiores em ambos os grupos porque as alterações no metabolismo lipídico estão intimamente ligadas à esteatose hepática. HLS + Dex tendeu a ter alteração lipídica semelhante a animais HLS, e isso sugere que a descarga causa mais danos do que a corticoterapia. Apesar disso, a glicose foi a principal alteração bioquímica encontrada, sugerindo sinergismo entre descarga e uso de dexametasona. Conforme relatado em outro lugar (9,12,16), a dexametasona pode causar resistência à insulina e hiperglicemia porque os corticosteroides reduzem a sensibilidade dos receptores de insulina (12), e isso pode estar relacionado a alterações nas propriedades da membrana celular (19). A descarga também pode reduzir os receptores de insulina na membrana, e os animais também usam menos energia do que o normal, então a glicemia fica mais alta (5). Os mecanismos pelos quais essas duas situações passam são diferentes ou podem ser superestimulados, pois a glicemia de HLS + Dex foi a mais alta encontrada.

Para as fibras musculares, descobrimos que o HLS foi capaz de reduzir a massa de todos os três músculos avaliados. Como visto no peso muscular, a descarga causou

redução da área de seção transversal das fibras dos músculos lentos e rápidos. Além disso, estudos comprovaram que o desuso principal via de atrofia é através do aumento da sinalização para proteólise (20), sendo que todos esses músculos foram afetados, pois todo o corpo permaneceu em repouso. Em contraste, Dex causou atrofia sóleo e gastrocnêmio, mas não alterou a área transversal anterior do tibial. Os mecanismos de atrofia dos corticosteroides estão relacionados à redução da sinalização para manter o equilíbrio no anabolismo e catabolismo, e o aumento do metabolismo da gordura causa a quebra de proteínas (9, 12, 21). O fato de tibial anterior de camundongos Dex não reduzir ao mesmo tempo que gastrocnêmio e sóleo pode estar relacionado à dosagem administrada ou à duração do protocolo (22). Alguns músculos podem ser os primeiros alvos dos corticosteroides devido à ativação, tipagem de fibras ou posição corporal. Surpreendentemente, HLS + Dex apresentou resultados divergentes para a área transversal. As fibras do gastrocnêmio foram semelhantes ao HLS, o que é esperado na condição HLS, mas os dados tibialis foram semelhantes aos de Dex. Essa divergência pode estar relacionada aos efeitos antiinflamatórios da dexametasona (22), sendo que esse corticosteroide poderia ter efeito protetor sobre esse músculo por mecanismos não conhecidos.

No entanto, as fibras do sóleo apresentaram resultados divergentes. Em vez de semelhante a uma ou outra condição, HLS + Dex soleus eram mais finos que o Controle, mas essa redução não era evidente como encontrada em HLS ou Dex. Na verdade, a área da seção transversal média das fibras desses três grupos não foi tão discrepante, mas por ser estatisticamente diferente, é importante pontuar o potencial antiinflamatório dos corticosteroides, que nem sempre podem estar prejudicando esses animais. Além disso, a espessura do osso cortical de camundongos HLS, Dex e HLS + Dex era mais fina do que o controle. A HLS conduz a osteoporose por meio da redução das forças de cisalhamento no osso (15, 23), e a corticoterapia altera o metabolismo do cálcio (8,9). Considerando que esses dois modelos possuem vias diferentes para a osteoporose, era de se esperar que os ossos HLS + Dex fossem ainda mais finos, mas isso pode ser evidenciado em protocolos mais longos. A mesma situação foi observada em fígados. Todos os grupos experimentais apresentaram danos nos hepatócitos. Não houve análise quantitativa para isso, mas os grupos HLS e HLS + dex apresentaram mais alterações na integridade parenquimatosa, e

o acúmulo de gordura parece ser maior. Esses animais também apresentavam mais componentes bioquímicos alterados, o que pode explicar esses achados histopatológicos.

Por último, para o teste de natação forçada, o descarregamento reduziu o desempenho conforme o esperado. O próprio desuso causa perda de força (3), e tem sido relatado que essa situação também causa redução cardiorrespiratória (5,24). Os músculos cardíacos e periféricos não conseguem lidar com a demanda para nadar. A corticoterapia também causa perda de função, mas o músculo cardíaco sofre com complicações coronárias ao invés de problemas de contração muscular, embora os músculos periféricos enfraqueçam (9,21,25). Novamente, HLS + Dex foi pior do que HLS e Dex separadamente, com uma redução drástica do desempenho de tempo em tempo absoluto e normalizado. HLS + Dex causou alteração sistêmica maior do que descarga ou corticoterapia, e isso pode não ser muito claro em variáveis biomecânicas ou bioquímicas, mas aparece na análise de função. Embora a massa muscular seja o principal dado relacionado à perda de força, apenas os dados bioquímicos foram significativamente correlacionados com a perda de desempenho. As concentrações de glicose, ALT e AST foram todas inversamente correlacionadas ao desempenho no teste de natação forçada. A própria glicose pode estar relacionada à maior concentração de produtos finais de glicação avançada, mudança energética para lipólise e proteólise e cetogênese (18, 26,27); tudo isso tem sido relacionado à perda de função de camundongos e humanos. ALT e AST foram informações hepáticas consistentes para todos os três tratamentos para identificar a insuficiência hepática, e essa hepatotoxicidade reflete o aumento do metabolismo da gordura, lipotoxicidade sistêmica e inflamação crônica (28).

Portanto, HLS + Dex reduz o peso corporal devido à perda de massa muscular e ao aumento do uso de gordura. Isso também pode ser potencializado ou atenuado pela nutrição. A perda de massa muscular também se apresenta com fibras musculares mais finas, mas a diminuição é heterogênea para os tipos de músculos, o que pode demorar mais para ser evidenciado. Isso também é encontrado na espessura cortical do osso, que não era drasticamente mais fino, embora houvesse diferentes vias que causam a osteoporose. A disfunção hepática retrata alterações de lipídios, AST, ALT e bilirrubina. Embora não houvesse semelhanças de corticoterapia e descarga no uso de lipídios e bilirrubina prejudicada, havia alterações comuns em AST e ALT que estavam relacionadas à perda de função. Além disso, a hiperglicemia foi a principal condição a ser correlacionada

à diminuição do desempenho. Assim, a glicemia é a informação mais rápida para sugerir perda drástica da função, embora outras informações bioquímicas e avaliações biomecânicas possam ajudar a rastrear a disfunção e possam desempenhar um papel mais importante em um cenário crônico. No entanto, a avaliação funcional é a melhor forma de evidenciar comprometimento sistêmico.

Agradecimentos

À CNPq e à CAPES por darem subsídios para a realização deste trabalho.

Conflitos de Interesse.

Nenhum.

Referências

- (1) Silva Jr CT. Profilaxia para o derrame pleural parapneumônico e empiema pleural. *Pulmão RJ* 2016; 25: 33-36.
- (2) Shah S, Goregaonkar AB. Conservative management of osteoporotic vertebral fractures: a prospective study of thirty patients. *Cureus* 2016; 8: 1-8 , doi: 10.7759/cureus.542.
- (3) Brasil. Ministério da Saúde. SIHSUS - Caderno de Informações de Saúde. Brasil. Brasília, 2010. available on: <http://datasus.saude.gov.br/sistemas-e-aplicativos/hospitales/sihsus>
- (4) Miokovic T, Armbrecht G, Gast U, Rawer R, Roth HJ, Runge M, Felsenberg D, Belavý DL. Muscle atrophy, pain, and damage in bed rest reduced by resistive (vibration) exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2014; 1506-1516, doi: 10.1249/MSS.0000000000000279.
- (5) Goto S, Ohshima T, Yamamoto T, Shimato S, Nishizawa T, Kato K. Successful steroid treatment of coma induced by severe spontaneous intracranial hypotension. *Nagoya J. Med. Sci* 2016; 78: 229-236.
- (6) Ko S, Kim S, Kim J, Ok T. The effectiveness of oral corticosteroids for management of lumbar radiating pain: randomized, controlled trial study. *Clinics in orthopedic Surgery* 2016; 8: 262-267, doi: 10.4055/cios.2016.8.3.262.
- (7) Sullivan PW, Ghushchyan VH, Globe G, Schatz M. Oral corticosteroid exposure and adverse effects in asthmatic patients. *K Allergy Clin Immunol* 2017; 1-7, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.009>.
- (8) Rice JB, White AG, Scarpati LM, Wan G, Nelson WW. Long-term systemic corticosteroid exposure: a systematic literature review. *Clinical Therapeutics* 2017; 39: 2216-2229, doi: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.09.011>.
- (9) Lloret A, Coiffier G, Couchouron T, Perdriger A, Guggernbuhl P. Risk factors of mortality during the first year after low energy osteoporosis fracture: a retrospective case-control study. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 2016; 13: 123-126, doi: 10.11138/ccmbm/2016.13.2.123.
- (10) Jesus FS, Paim DM, Brito JO, Barros IA, Nogueira TB, Martinez BP, Pires TQ. Declínio da mobilidade dos pacientes internados em unidade de terapia intensiva. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 2016; 28: 114-119, doi: <http://dx.doi.org/10.5935/0103-507X.20160025>.

- (11) Alway SE, Bennett BT, Wilson JC, Sperringer J, Mohamed JS, Edens JS, Pereira SL. Green tea extract attenuates muscle loss and improves muscle function during disuse, but fails to improve muscle recovery following unloading in aged rats. *J Appl Physiol* 2015; 118: 319-330, doi: 10.1152/jappphysiol.00674.2014.
- (12) Macedo AG, Krug ALO, Souza LM, Martuscelli AM, Constantino PB, Zago AS, Rush JWE, Santos CF, Amaral SL. Time-course changes of catabolic proteins following muscle atrophy induced by dexamethasone. *Steroids* 2016; 107: 30-36, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2015.12.016>.
- (13) Ikeuchi M, Koyama T, Takahashi J, Yazawa K. Effects of astaxanthin supplementation on exercise-induced fatigue in mice. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 2106-2110.
- (14) Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature Protocols* 2012; 7: 1009-1014, doi: 10.1038/nprot.2012.044.
- (15) He J, Feng X, W J, Shi W, Li H, Danilchenko S, Kalinkevich A, Zhovner M. Icariin prevents bone loss by inhibiting bone resorption and stabilizing bone biological apatite in a hindlimb suspension rodent model. *Nature Acta Pharmacologica Sinica* 2018; 0: 1-8, doi: <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0040-8>.
- (16) Maltais A, Alméras N, Lemieux I, Tremblay A, Bergeron J, Poirier P, Després JP. Trunk muscle quality assessed by computed tomography: association with adiposity indices and glucose tolerance in men. *Metabolism* 2018; 53778: 1-14, doi: 10.1016/j.metabol.2018.04.003.
- (17) Carnagarin R, Dharmarajan AM, Dass CR. Molecular aspects of glucose homeostasis in skeletal muscle - a focus on the molecular mechanisms of insulin resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2015; 9271: 1-14, doi: 10.1016/j.mce.2015.09.004.
- (18) Molena-Fernandes C, Bersani-Amado CA, Ferraro ZM, Hintze LJ, Nardo Jr N, Cuman RKN. Effects of exercise and metformin on the prevention of glucose intolerance: a comparative study. *Braz J Med Biol Res* 2015; 48: 1101-1108, doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20153904>.
- (19) Lee S, Norheim F, Gulseth HL, Langlete TM, Aker A, Gundersen TE, Holen T, Birkeland KI, Drevon CA. Skeletal muscle phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine respond to exercise and influence insulin sensitivity in men. *Nature Scientific Reports* 2018; 8: 1-12, doi: 10.1038/s41598-018-24976-x.
- (20) Cheon W, Lim K. Change of gene expression on protein uptake composition and hindlimb-suspension in rat skeletal muscle. *J Exerc Nutr Biochem* 2015; 19: 107-113, doi: <http://dx.doi.org/10.5717/jenb.2015.15052508>.
- (21) Arpan I, Willcocks RJ, Forbes SC, Finkel RS, Lott DJ, Rooney WD, Triplett WT, Senesac CR, Daniels MJ, Byrne BJ, Finanger EL, Russman BS, Wang DJ, Tennekoon GI, Walter GA, Sweeney HL, Vandenborne K. Examination of effects of corticosteroids on skeletal muscles of boys with dmd using mri and mrs. *Neurology* 2014; 83: 974-980, doi: 10.1212/WNL.0000000000000775.
- (22) Wilcox RS. Corticosteroids and neuromuscular blockers in development of critical illness neuromuscular abnormalities: a historical review. *Journal of Critical Care* 2017; 37: 149-155, doi: 10.1016/j.jcrc.2016.09.018.
- (23) Colaianni G, Mongelli T, Cuscito C, Pignataro P, Lippo L, Spiro G, Notarnicola A, Severi I, Passeri G, Mori G, Brunetti G, Moretti B, Tarantino U, Colucci SC, Reseland JE, Vettor R, Cinti S, Grano M. Irisin prevents and restores bone loss and muscle atrophy in hind-limb suspended mice, *Nature Scientific Reports* 2017; 7: 1-16, doi: 10.1038/s41598-

017-02557-8.

- (24) Labeit S, Kohl CH, Witt CC, Labeit D, Jung J, Granzier H. Modulation of muscle atrophy, fatigue and mlc phosphorylation by murf1 as indicated by hindlimb suspension studies on murf1-ko mice. *Journal of Biomedicine and Niotechnology* 2010, 693741: 1-9, doi: 10.1155/2010/693741.
- (25) Gayan-Ramirez G, Decramer M. Mechanisms of striated muscle dysfunction during acute exacerbations of COPD. *J Appl Physiol* 2013; 114: 1291-1299, doi: 10.1152/jappphysiol.00847.2012.
- (26) Reddy VS, Jakhotia S, Reddy PY, Reddy GB. Hyperglycemia induced expression, phosphorylation, and translocation of ab-crystallin in rat skeletal muscle. *IUBMB Life* 2015; 67: 291-299, doi: 10.1002/iub.1370.^[...]_[SEP]
- (27) Sha H, Tong X, Zhao J. Abnormal expressions of ages, tgf-b1, bdnf and their receptors in diabetic rat colon - associations with colonic morphometric and biomechanical remodeling. *Nature Scientific Reports* 2018; 8: 1-14, doi: 10.1038/s41598-018-27787-2.
- (28) Warfei JD, Bermudez EM, Mendoza TM, Ghosh S, Zhang J, Elks CM, Mynatt R, Vandanmagsar B. Mitochondrial fat oxidation is essential for lipid-induced inflammation in skeletal muscle in mice. *Nature Scientific Reports* 2016; 6: 1-13, doi: 10.1038/srep37941.

Tabelas do Artigo - Potencialização de efeitos colaterais em modelo de atrofia por desuso decorrente de corticoterapia

Tabela 1 - Gordura e Músculo de camundongos em corticoterapia e suspensão.

	Controle	Dex	HLS	Dex+HLS
Gordura	0.68±0.17a	0.96±0.15b	0.13±0.11c	0.05±0.02c
Gastrocnemio	122.66±8.11a	104.16±2.85b	93.66±2.48c	92.00±1.44c
Sóleo	10.35±0.55a	9.73±0.57a	8.51±0.74b	7.26±0.52c
Tibial	60.06±2.02a	54.93±2.23b	46.00±2.22c	38.6±3.95d

Controle: animais em gaiolas regulares; Dex: animais em gaiolas regulares recebendo 0,5mg / kg / dia de Dexametasona; HLS: animais sob suspensão do membro posterior; HLS + Dex: animais sob Suspensão do membro posterior associada a 0,5mg / kg / dia de Dexametasona. Dados expressos como média ± desvio padrão (mg). Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Bonferroni.

Tabela 2 - Bioquímica de camundongos em corticoterapia e suspensão.

	Controle	Dex	HLS	Dex+HLS
Glicose	94.20±2.29a	149.12±0.92b	139.65±1.16c	164.13±3.10d
TG	84.16±3.14a	94.91±2.41b	71.75±1.78c	71.58±1.02c
TC	100.83±2.04a	108.25±4.24b	80.16±5.11c	87.91±1.02d
HDL-c	60.91±2.01a	51.00±2.12b	61.75±1.92a	62.91±1.42a
ALT	54.50±2.23a	61.25±0.68b	72.16±1.72c	72.33±1.53c
AST	71.41±1.32a	82.58±1.39b	91.58±0.97c	92.41±0.58c
Bilirrubina	0.11±0.02a	0.12±0.01a	0.18±0.02b	0.20±0.01b

Controle: animais em gaiolas regulares; Dex: animais em gaiolas regulares recebendo 0,5mg / kg / dia de Dexametasona; HLS: animais sob suspensão do membro posterior; HLS + Dex: animais sob Suspensão do membro posterior associada a 0,5mg / kg / dia de Dexametasona. TG: Triglicerídeos, CT: Colesterol total, ALT: Alanina transaminase, AST: Aspartato transaminase. Dados expressos como média ± desvio padrão (mg / dL). Letras diferentes significam diferença estatística, ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Bonferroni.

Tabela 3 – Correlações de parâmetros bioquímicos com o nado forçado.

Dado	χ^2	p-valor
Glicose	61,55	<0.0001
TG	32,23	0,0954
CT	31,06	0,1212
HDL-c	33,05	0.0802
ALT	44,98	0,0040
AST	44,90	0,0041
Bilirrubina	47,05	0,2200
Gordura	23,48	0,4330
Tibia	23,17	0,4500
Gastrocnemio	25,38	0,3300

TG: Triglicérides, CT: Colesterol total, ALT: Alanina transaminase, AST: Aspartato transaminase.

5 CONCLUSÃO

- Repouso absoluto gera maiores distúrbios que a corticoterapia;
- Nos divergentes distúrbios causados por desuso e corticoterapia, os animais no grupo de associação dos dois modelos tenderam a apresentar alterações similares ao desuso;
- Atrofia por desuso pode causar redução da massa gordurosa, por aumentar o gasto de lipídeos;
- Corticoterapia afeta alguns músculos mais rapidamente que outros;
- Glicemia e níveis de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase estão inversamente relacionados com performance funcional;
- Alterações funcionais, além de mais importantes, são as sequelas detectadas mais rapidamente;
- O uso de dexametasona agrava variáveis em comum com a atrofia por desuso, mas os parâmetros funcionais e bioquímicos são evidenciados mais rapidamente que os biomecânicos.

REFERÊNCIAS

- ALHEIRA, F. V.; BRASIL, M. A. A. O papel dos glicocorticoides na expressão dos sintomas de humor-uma revisão. **Rev Psiquiatr**, v.27, n.2, p.177-186, 2005.
- ALI, M. U.; FITZPATRICK-LEWIS, D.; KENNEDY, M. et al. A systematic review of short-term vs long-term effectiveness of one-time abdominal aortic aneurysm screening in men with ultrasound. **J Vasc Surg**, v.68, n.2, p.612-623, 2018.
- ALWAY, S. E.; BENNETT, B. T.; WILSON, J. C. et al. Green tea extract attenuates muscle loss and improves muscle function during disuse, but fails to improve muscle recovery following unloading in aged rats. **J Appl Physiol**. v.118, n.3, p.319-330, 2015.
- ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Antiinflamatórios hormonais: glicocorticoides. **Einstein**, v.6, s.1, p.S159-S165, 2008.
- BAERTSCHI, B. The gift of human body's products: philosophical and ethical aspects. **Gynecol Obstet Fertil**, v.42, n.9, p.649-652, 2014.
- BACK NETTO, M. OLIVEIRA JUNIOR, A. N. GOLDIM, M. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction contributes to postoperative cognitive dysfunction in elderly rats. **Brain, Behavior and Immunity**, Em correção. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.07.016>>. Acesso em: 25 jul. 2018.
- BARBOSA, A. A.; CARLO, R. J.; GALVÃO, S. R. et al. Bone mineral density of rat femurs after hindlimb unloading and different physical rehabilitation programs. **Revista Ceres**, v.58, n.4, 2011.
- CAULEY, J. A.; BLACK, D.; BOONEN, S.; et al. on behalf of the HORIZON Pivotal Fracture Group. Once-yearly zoledronic acid and days of disability, bed rest, and back pain: randomized, controlled horizon pivotal fracture trial. **J Bone Miner Res**, v.26, n.5, p.984-992, 2011.

CREAGER, A. N. H. Human bodies and chemical sensors: a history of biomonitoring for environmental health and regulation. **Studies in History and Philosophy of Science Part A**. Estados Unidos: Elsevier, 2018.

DANTAS, C. M.; SILVA, P. F. S.; SIQUEIRA, F. H. T. et al. Influência da mobilização precoce na força muscular periférica e respiratória em pacientes críticos. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, n. 2, p.173-178, abril/junho, 2012.

ENGLISH, K. L.; PADDON-JONES, D. Protecting muscle mass and function in older adults during bed rest. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.13, n.1, p.34-39, 2010.

FAÇAFISIOTERAPIA. Saiba mais sobre atrofia muscular e seus tipos. Disponível em: <<http://www.facafisioterapia.net/2015/02/saiba-mais-sobre-atrofia-muscular-e.html>>. Acesso em: 26 jul. 2018.

FEDORUK, M. J.; HONG, S. Musculoskeletal System. **Encyclopedia of Toxicology**, terceira edição, Estados Unidos: Elsevier, 2014, 4p.

FERREIRA, R.; NEUPARTH, M. J.; ASCENÇÃO, A. et al. Atrofia muscular esquelética. modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v.4, n.3, p.94-111, 2004.

GITLER, S.; RÁMIREZ, I.; RAMÍREZ, R.; et al. Músculo esquelético: del nacimiento a la vejez, rutas hacia la falla mecánica y metabólica. **Gaceta Médica de México**, v.153, n.2, p.60-71, 2017.

GUIMARÃES, J. L.; ADELL, E. A. A. **Estrutura e Bioquímica do Músculo**. Apostila do Laboratório de Carnes. São Paulo: UNICAMP, 1995, 34p.

GOTO, S.; OHSHIMA, T.; YAMAMOTO, T.; et al. Successful steroid treatment of coma induced by severe spontaneous intracranial hypotension. **Nagoya J. Med. Sci**, v.78, p.229-236, 2016.

HELENA, A. Escatologia - 1ª parte/aula 2 - a existência da alma. Disponível em: <<http://adaliahelena.blogspot.com/2015/09/escatologia-1-parte-aula-2-existencia.html>>. Acesso em: 26 jul. 2018.

HUANG, C. C.; HSU, M. C.; HUANG, W. C. et al. Triterpenoid-rich extract from *antrodia camphorata* improves physical fatigue and exercise performance in mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2012, n.364741, 2012.

HUANG, C. W.; HSU, Y. J.; WEI, L.; et al. Association of physical performance and biochemical profile of mice with intrinsic endurance swimming. **International Journal of Medical Sciences**, v.13, n.12, p.891-901, 2016.

INSTITUTO PORTUGUÊS DE REUMATOLOGIA. Internamento. Disponível em: <<http://www.ipr.pt/index.aspx?p=MenuPage&MenuId=248>>. Acesso em: 26 jul. 2018.

JESUS, F. S.; PAIM, D. M.; BRITO, J. O.; et al. Declínio da mobilidade dos pacientes internados em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.28, n.2, p.114-119, 2016.

KLEIN, G. L. The effect of glucocorticoids on bone and muscle. **Osteoporosis and sarcopenia**, v.1, n.1, p.39-45, setembro, 2015.

KO, S.; KIM, S.; KIM, J.; OK, T. The effectiveness of oral corticosteroids for management of lumbar radiating pain: randomized, controlled trial study. **Clinics in orthopedic Surgery**, v.8, p.262-267, 2016.

LEGARE, C. H.; OPFER, J. E.; BUSCH, J. T. A.; SHTULMAN, A. A field guide for teaching evolution in the social sciences. **Evolution and Human Behavior**, v.39, n.3, p.257-268, 2018.

LEITE, S. N.; VIEIRA, M.; VEBER, A. P. Estudos de utilização de medicamentos: uma síntese de artigos publicados no Brasil e América Latina. **Ciências e Saúde Coletiva**, v.13, n.0, 2008.

LIRA, C. A. B.; OLIVEIRA, J. N. S.; ANDRADE, M. S. et al. Conhecimento, percepções e utilização de medicamentos genéricos: um estudo transversal. **Einstein**, v.12, n.3, p.267-273, 2014.

LIU, T. The scientific hypothesis of an energy system in the human body. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v.5, n.1, p.29-34, 2018.

LLORET, A.; COIFFIER, G.; COUCHOURON, T.; et al. Risk factors of mortality during the first year after low energy osteoporosis fracture: a retrospective case-control study. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v.13, n.2, p.123-126, 2016.

LOCQUET, M.; BEAUDART, C.; HAJAOUI, M.; et al. Three-year adverse health consequences of sarcopenia in community-dwelling older adults according to 5 diagnosis definitions. **J Am Med Dir Assoc**, v.7, n.S1525-8610, 2018.

MAGALHÃES, A. J. B.; CASTOLDU, R. C.; CAMARGO, R. C. T.; et al. Efeito do destreinamento sobre a composição corporal de ratos submetidos à dieta padrão e hipercalórica. **Colloq Vitae**, v.7, n.3, p.15-25, 2015.

MASHINCHIAN, O.; PISCONTI, A.; MOAL, E.; BENTZINGER, C. F. The muscle stem cell niche in health and disease. **Current Topics in Developmental Biology**. Volume 126. Estados Unidos: Elsevier, 2017. p.65.

MASOOD, T.; KALLIOKOSKI, K.; BOJSEN-MOLLER, J.; FINNI, T. Muscle-tendon glucose uptake in achilles tendon rupture and tendinopathy before and after eccentric rehabilitation: comparative case reports. **Physical Therapy in Sport**, v. 11, n.3, p.28, 2015.

MARTINEZ, B. P.; SANTOS, M. S.; SIMÕES, L. P. et al. Segurança e reprodutibilidade do teste timed up and go em idosos hospitalizados. **Rev Bras Med Esporte**. v.22, n.5, p.408-411, 2016.

MARTINI, F.; TIMMONS, M.; PEARSON, R. T. Human Anatomy. **Emergency Nurse**, v.21, n.4, c.11, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SIHSUS - **Caderno de Informações de Saúde**. Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Acessado em: 09/03/2017 às 14:22, disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/sistemas-e-aplicativos/hospitalares/sihsus>.

MIOKOVIC, T.; ARMBRECHT, G.; GAST, U.; et al. Muscle atrophy, pain, and damage in bed rest reduced by resistive (vibration) exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. p.1506-1516, 2014.

NICASTRO, H.; ZANCHI, N. E.; GUALANO, B. et al. Atrofia muscular esquelética: indução por glicocorticoides e supressão pela suplementação de creatina. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v.8, n.1, p.97-111, 2009.

NORTON, L.; DEFRONZO, R. Skeletal muscle glucose metabolism and insulin resistance. **Pathobiology of Human Disease: a dynamic encyclopedia of disease mechanisms**, Estados Unidos: Elsevier, 2014, cap.12.

OMS - **Organização Mundial de Saúde**. Conceito de saúde. Disponível em: <<http://www.who.int/about/mission/en/>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

OMS - **Organização Mundial de Saúde**. Conceito de saúde: atualizado. Disponível em: <<http://www.who.int/about/mission/en/>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

PARK, S.; KIM, K.; PARK, M. Effect of 24-hour bed rest versus early ambulation on headache after spinal anesthesia: systematic review and meta-analysis. **Pain Management Nursing**, v.19, n.3, p.267-276, junho, 2018.

PATEL, A.; MANDOVRA, P.; MAJEED, T.; PATANKAR, R. V. Combined laparoscopic and perineal approach for the management of recurrent tailgut cyst. **Asian J Endosc Surg**, v.7, n.12619, 2018.

PEREIRA, H. C. B.; DUARTE, P. H. M.; MÉLO, T. M. et al. Intervenção fisioterapêutica na síndrome da imobilidade em pessoas idosas: revisão sistematizada. **Arch Health Invest**, v.6, n.11, p.505-508, 2017.

POZZOBON, A.; PEREIRA, G. A. M.; JUNG, L. **Anatomia na Prática: Sistema Musculoesquelético**, Lajedo: Univates, 2015, 220p.

PRATS, J. A. G. G.; GASPAR, A. J.; RIBEIRO, A. B. G. et al. Revisão sistemática do uso da dexametasona como terapia adjuvante na meningite bacteriana em crianças. **Rev Paul Pediatr**, v.30, n.4, p.586-593, 2012.

RAIS LIFE. Você sabe qual a diferença entre comprimido, drágea e cápsula?. Disponível em: < <https://raislife.com/blog/voce-sabe-qual-diferenca-entre-comprimido-dragea-e-capsula/>>. Acesso em: 26 jul. 2018.

REN, L.; QIAN, Z.; REN, L. Biomechanics of musculoskeletal system and its biomimetic implications: a review. **Journal of Bionic Engineering**, v.11, n.2, p.159-175, abr., 2014.

REIDY, P. T.; LINDSAY, C. C.; MCKENZIE, A. I. et al. Aging-related effects of bed rest followed by eccentric exercise rehabilitation on skeletal muscle macrophages and insulin sensitivity. **Experimental Gerontology**, v.107, n.1, p.37-49, julho, 2018.

RODRIGUES, A. L. P.; SOUZA, V. R. Eficiência do teste timed up and go na predição de quedas em idosos atendidos em uma unidade básica de saúde de fortaleza-ce. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v.10, n.58, 2016.

SANTOS, C. L.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J. R. Effects of dexamethasone administration in vivo on glycaemia, insulinaemia and circulating substrates are dependents of time of treatment. **Biosci J**, v.23, n.3, p.101-110, julho/setembro, 2007.

SCHMIDT, B. **Programa Ciência Livre**. Morfologia do Músculo Esquelético 1. Disponível em: < <https://www.programaciencialivre.com.br/single-post/2015/04/07/Morfologia-do-Músculo-Esquelético-1>>. Acesso em: 26 jul. 2018.

SHAH. S.; GOREGAONKAR, A. B. Conservative management of osteoporotic vertebral fractures: a prospective study of thirty patients. **Cureus**. v.8, n.3, e542, 2016.

SHIMANO, M. M.; VOLPON, J. B. Mechanical behavior of rats' femoral proximal thirds after a period of tail suspension and exercises. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.15, n.5, 2007.

SHORTREED, K. E.; KRAUSE, M. .P.; HUANG, J. H.; et al. Muscle-specific adaptations, impaired oxidative capacity and maintenance of contractile function characterize diet-induced obese mouse skeletal muscle. **Plos One**, v.4, n.10, e7293, 2009.

SILVA, M. E. M.; FEUSER, M. R.; SILVA, M. P.; et al. Cirurgia cardíaca pediátrica: o que esperar da intervenção fisioterapêutica?. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v.26, n.2, p.264-272, abril/junho, 2011.

SILVA, V. S.; PINTO, J. G.; MARTINEZ, B. P.; CAMELIER, F. W. R. Mobilization in the intensive care unit: systematic review. **Fisioterapia e Pesquisa**, v.21, n.4, p.398-404, oct/dec, 2014.

SILVA JUNIOR, C. T. S. Profilaxia para o derrame pleural parapneumônico e empiema pleural. **Pulmão RJ**, v.25, n.1, p.33-36, 2016.

TIERNEY, M. T.; AYDOGDU, T.; SALA, D. et al. Stat3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal muscle repair. **Nature Medicine**, v. 2014, n.3656, p.1-7, 2014.

TODAMATÉRIA. Sistemas do Corpo Humano. Disponível em: <<https://www.todamateria.com.br/sistemas-do-corpo-humano/>>. Acesso em: 26 jul. 2018.

UNIC – Unidade de Cuidados. **Manual de cuidados paliativos em pacientes com câncer**. editora UNATI/uerj.ABERTA 3.IDADE. Rio de Janeiro, 2009.

WANG, S. Y.; HUANG, W. C.; LIU, C. C. et al. Pumpkin (cucurbita moschata) fruit extract improves physical fatigue and exercise performance in mice. **Molecules**, v.17, p.11864-11876, 2012.

WIKIMEDIACOMMONS. Forced Swim Test. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:201407_porsolt_forced_swim_test.png>. Acesso em: 26 jul. 2018.

XU, C.; Lv, J.; LO, Y. M. et al. effects of oat β -glucan on endurance exercise and its anti-fatigue properties in trained rats. **Carbohydr Polym**, v.92, p.1159-1165, 2013.

ZHAO, L.; ZOU, T.; GOMEZ, N. A. et al. Raspberry alleviates obesity-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle through activation of amp-activated protein kinase (ampk) α 1. **Nutrition & Diabetes**, v.8, n.39, p.1-8, 2018.

ZHOU, X.; ZHANG, Y.; WU, X.; WAN, D.; YIN, Y. Effects of dietary serine supplementation on intestinal integrity, inflammation and oxidative status in earl-weaned piglets. **Cell Physiol Biochem**, v.48, n.3, p.993-1002, 2018.

APÊNDICE A – RESUMO 1 APRESENTADO NO VIII SINATER

Area: Therapeutic.

CHRONIC USE OF DEXAMETHASONE DECREASES MICE RESPONSE TO THE FORCED SWIM TEST

Oliveira, J.R.S.¹, Cunha, R.X. ¹, Nascimento, W.M. ¹, Lima, V.L.M.¹.

1- Departamento de Bioquímica, CCB – UFPE.

INTRODUCTION: Corticosteroids form a very powerful group of anti-inflammatory medicines. Although their benefits, corticosteroids lead to changes in energy metabolism, can cause osteoporosis, and increase cardiovascular risks. **OBJECTIVE:** To investigate the effects of chronic corticosteroid administration on mice performance in an exhaustive test. **METHODOLOGY:** This study had approval from the Committee of Research and Ethics with Animals of UFPE (n^o0008/2017). 10 male mice, ten weeks old, were divided in two groups (Vehicle and Dexamethasone). Animals received water or water containing 0,5mg/kg of Dexamethasone during 14 days. All animals were housed individually, with water and food *ad libitum*. Weight was measured on the 1st, 7th, and 14th day. On the 14th day, mice performed the forced swim test with 10% of body weight attached to them. Then, mice were anesthetized, and epididymis fat was measured. Animals were euthanized after fat removal. **RESULTS:** Body weight of the Dexamethasone group decreased on the 7th day, and kept decreasing up to the 14th day ($p < 0,001$). Vehicle group had no changes in body weight. There was no difference in epididymis fat weight between both groups. The forced swim test performance of Dexamethasone group was above 60% lower than Vehicle group ($p < 0,001$) **CONCLUSION:** 14 days of Dexamethasone administration decreases mice swimming time on the forced swim test.

KEYWORDS: Corticosteroid; Forced Swim Test; Body Weight.

APÊNDICE B – RESUMO 2 APRESENTADO NO VIII SINATER

Area: Diagnostic.

Hind-limb Suspension Causes Liver Damage through Increase in Fat Metabolism

Oliveira, J.R.S.¹, Lima, V.L.M.¹.

1- Departamento de Bioquímica, CCB – UFPE.

INTRODUCTION: Hind-limb suspension is a well-known technique utilized to investigate muscle mass loss, and ways to prevent it. This method also has been related to acute insulin resistance, and weight loss. This weight loss and its events of insulin resistance suggest that hind-limb suspension increase fat metabolism. **OBJECTIVE:** To analyse the relationship between weight loss and lipids metabolism in mice under a hind-limb suspension protocol. **METHODOLOGY:** 10 male mice, ten weeks old, were placed into group Cage (n=5), or group Suspension (n=5). This study had approval from the Committee of Research and Ethics with Animals of UFPE (nº0008/2017). Animals stayed on regular cages, or were suspended for two weeks individually in cages with water and food *ad libitum*. Weight was measured on the 1st, 7th, and 14th day. Blood from retro-orbital plexus was collected on the 14th day to quantify triglycerides concentration. After anesthetized, mice had liver removed for histological analysis, and epididymis fat weighted. Animals were euthanized after liver and fat removal. **RESULTS:** Both groups started with the same body weight, but the Suspension group had lower body mass at the end of the study. Cage group had higher triglycerides concentration than Suspension group. Tissue samples stained with haematoxylin and eosin of the Suspension group showed fat deposition (vacuolation of hepatocytes). **CONCLUSION:** Hind-limb suspension increases usage of fat energy. Thus, it causes fat deposition on liver that leads to hepatocytes death.

KEYWORDS: Hind-Limb Suspension; Triglycerides, Liver.

APÊNDICE C – RESUMO APRESENTADO NA 47ª REUNIÃO ANUAL DA SBBq

Effects of Hind Limb Suspension on Whole Body Weight of Mice

Oliveira, J.R.S.; Carvalho, V.C.O.; Silva, A.P.S.; Brito, T.G.S.; Cunha, R.X.; Nascimento, W.M.; Lima, V.L.M.

Dep de Bioquímica, UFPE, PE, Brazil.

Introduction: Hind limb Suspension (HLS) is a method to evaluate muscle damage, and in some protocols further recovery. This technique is known to be very specific for the hind limbs, but its systemic effects such as dysfunctions in circulation and spine biomechanics have been reported. **Objective:** This study aimed to investigate alterations in the body composition due to a hind limb suspension on adult mice. **Methods:** This study has approval from the Federal University of Pernambuco Committee of Ethics and Research with Animals, protocol nº0008/2017. Male mice (N = 12) were divided into Control group (animals in regular cages), and HLS group (suspended animals). Animals were observed during 14 days with water and food *ad libitum*. On Day 1, animals were weighted, and the group HLS was suspended. All Animals started with 35 g. On Day 14, animals had epididymis fat collected and weighted; muscle soleus was removed for histological analysis with hematoxylin and eosin staining. Blood samples were collected, centrifuged and the serum used to measure glucose. Data was expressed as mean \pm SD, and analyzed with *t* test. **Results:** No alteration was found in the weight of the Control group. However, HLS animals had body weight depression when compared to the first day ($p < 0.0001$), and also when compared to Controls ($p < 0.0001$). Epididymis fat of HLS was reduced in 75% when compared to Control ($p < 0.0001$). Serum glucose was significantly increased ($p < 0.001$) in HLS animals 139.5 ± 1.2 mg/dL in comparison to controls (94.5 ± 2.5 mg/dL). Soleus samples from Control group presented regular size of fibers with no presence of inflammation. Soleus muscle of HLS did not show inflammation, but the fibers presented polygonal shape, indicating atrophy. **Conclusion:** The HLS process affected body weight by reducing lean mass, and fat mass. Furthermore, HLS induced muscle atrophy, which increased serum glucose levels.

Keywords: Hind Limb Suspension, Body Composition, Glucose

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 02 de maio de 2017.

Ofício nº 35 /17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.^a Vera Lúcia de Menezes Lima**

Departamento de Bioquímica

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **0008/2017**

Certificamos que a proposta intitulada **"Avaliação de Alterações Musculoesqueléticas e Bioquímicas após 14 dias de Suspensão das Patas Traseiras Associadas ao Uso de Corticosteroide** registrada com o nº **0008/2017** sob a responsabilidade de **Prof.^a Vera Lúcia de Menezes Lima** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 26/04/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	30/03/2017 a 31/10/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico/ Mus musculus
Nº de animais	50
Peso/Idade	30-35g / 0-14 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Atenciosamente

Pedro V. Carelli


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
 Presidente da CEUA / CCB - UFPE
 SIAPE 1801584

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA



Guidelines for Authors

Scope and Policy

The purpose of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research is to publish the results of original experimental research that contribute significantly to knowledge in medical and biological sciences. Major criteria for acceptance are scientific quality, originality, and conciseness. Preference will be given to manuscripts that develop new concepts or experimental approaches and are not merely repositories of data. Papers that report negative results require special justification for publication. Methodological papers shall be considered for publication provided they describe new principles or a significant improvement of an existing method.

The following papers will not be accepted for publication

- Studies on people not approved by an accredited Ethics Committee or without written informed consent from the subject or legal guardian.
- Studies on animals not approved by an accredited Ethics and Animal Care Committee.
- Manuscripts that report preliminary results or only confirm previously reported results.
- Manuscripts that describe the pharmacokinetics, bioavailability and toxicity of drugs in people or animals.
- Manuscripts that deal with transcultural adaptation and validation of instruments of measurements.
- Manuscripts that translate a text published in another language and validate it on local patients.
- Manuscripts that use questionnaires translated from the language of another country and their validation in local patients.
- Manuscripts that present only in silico analysis.
- Manuscripts from the area of veterinary medicine.

Publication Charges

The authors are responsible for “publication charges” of all accepted papers. Publication charges will be billed to the Corresponding Author when the paper is accepted.

The charge is R\$3.300,00/paper for Brazilian authors and US\$1600.00/paper for authors outside Brazil and is independent of the length of the paper. The Journal does not provide reprints to corresponding authors. They will receive a CD containing the issue in which their article is published. There is no charge for figures in color. Please contact Reinaldo de Souza (bjournal@terra.com.br) if you have any question.

Preparation of Research Manuscripts

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research publishes original research articles of outstanding scientific significance. Manuscripts must be submitted in English. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a limited number of experiments. The key criteria are that the research clearly demonstrates its novelty, its importance to a particular field as well as its interest to those outside that discipline, and conclusions that are justified by the data.

Authorship requirements

Only those persons who contributed directly to the intellectual content of the paper should be listed as authors. Authors should meet all of the following criteria, thereby allowing persons named as authors to take public responsibility for the content of the paper.

- Conceived, planned and carried out the experiments that led to the paper or interpreted the data it presents, or both.
- Wrote the paper, or reviewed successive versions.
- Approved the final version.
- Holding positions of administrative leadership, contributing patients, and collecting and assembling data, however important to the research, are not by themselves criteria for authorship. Other persons who have made substantial, direct contributions to the work but cannot be considered authors should be cited in the Acknowledgment section, with their permission, and a description of their specific contributions to the research should be given.

Cover Letter

It is important that you include a cover letter with your manuscript. Take the time to consider why this manuscript is suitable for publication in the Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Why will your paper inspire the other members of your field, and how will it drive research forward? Please explain this in your cover letter.

The cover letter should also contain the following information:

- Title of article.
- Name(s) of all author(s).

Preparation of Research Manuscripts

- Name, complete mailing address, including zip code, telephone number, fax number and e-mail of author to whom correspondence should be sent.
- If a version of the manuscript has been previously submitted for publication to another journal, include comments from the peer reviewers and indicate how the authors have responded to these comments.
- Papers in the area of Clinical Investigation should include a statement indicating that the protocol has been approved by the Hospital Ethics Committee (Hospital with which at least one of the authors is associated) and that written informed consent was obtained from all participants. This information must also be cited in the Material and Methods section of the manuscript.

Text format

- The text of a manuscript can only be accepted as a Microsoft Word file created with MS Word as a “doc”, “docx” or “rtf” document.
- Each page should contain the page number in the upper right-hand corner starting with the title page as page 1.
- Report all measurements in Système International, SI (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) and standard units where applicable (see below).
- Do not use abbreviations in the title and limit their use in the abstract and text.
- The length of the manuscript and the number of tables and figures must be kept to a minimum.
- Ensure that all references are cited in the text.
- Generic names must be used for all drugs. Instruments may be referred to by proprietary name; the name and country or electronic address of the manufacturer should be given in parentheses in the text.

Guidance on grammar, punctuation, and scientific writing can be found in the following sources:

- Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers. 8th edn. Rockefeller University Press, Reston, 2006.<http://www.scientific-styleandformat.org/Home.html>
- Medical Style and Format. Huth EJ (Editor). ISI Press, Philadelphia, 1987, Marketed by Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Preparation of Research Manuscripts

- Writing scientific articles like a native English speaker: top ten tips for Portuguese speakers. *Clinics (Sao Paulo)*. Mar 2014; 69(3): 153-157. doi: 10.6061/clinics/2014(03)01. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3935133/>

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine (<http://www.icmje.org/>).

The writing style should be concise and accessible. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions.

Although we encourage submissions from around the globe, we require that manuscripts be submitted in American English. As a step towards overcoming language barriers, we encourage authors to seek the assistance of professional services available on the site.

Footnotes

Text footnotes, if unavoidable, should be numbered consecutively in superscript in the manuscript and written on a separate page following the abstract.

Abbreviations

Abbreviations should be kept to a minimum. Define all abbreviations upon first use in the abstract and the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

- Explain all abbreviations in the abstract, text, figure and table legends when they first appear. Keep the number of abbreviations to a minimum.
- Do not explain abbreviations for units of measurement [3 mL, not 3 milliliters (mL)] or standard scientific symbols [Na, not sodium (Na)].
- Abbreviate long names of chemical substances and terms for therapeutic combinations. Abbreviate names of tests and procedures that are better known by their abbreviations than by the full name (VDRL test, SMA-12).
- Use abbreviations in figures and tables to save space, but they must be defined in the legend.

Manuscript Categories

Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a Full-length Paper, Short Communication, Review Article, Overview, Concepts and Comments, or Case Report.

Full-length paper

Each manuscript should clearly state its objective or hypothesis; the experimental design and methods used (including the study setting and time period, patients or participants with inclusion and exclusion criteria, or data sources and how these were selected for the study); the essential features of any interventions; the main outcome measures; the main results of the study; and a discussion placing the results in the context of published literature.

The manuscript should contain:

- abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- the text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), without a separate section for conclusions
- no more than 40 references (without exceptions)

Organization of the Manuscript

Most articles published in the Brazilian Journal of Medical and Biological Research will be organized into the following sections:

- Title, Authors, Affiliations, Abstract, Key words, Running Title, Author for Correspondence and email address
- Introduction
- Material and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgments
- References
- Tables with a short descriptive title and footnote legends
- Figures with a short descriptive title, descriptive legends and uniformity in format

Continuous page numbers are required for all pages including figures. There are no specific length restrictions for the overall manuscript or individual sections. However, we urge authors to present and discuss their findings concisely. We recognize that some articles will not be best presented in our research article format. If you have a manuscript that would benefit from a different format, please contact the editors to discuss this further.

Title Page

The title should be as short and informative as possible, should not contain non-standard acronyms or abbreviations, and should not exceed two printed lines. Example: **Single-step purification of crotapotin and crotactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing**

Authors and Affiliations

Initials and last name(s) of author(s) (matched with superscript numbers identifying institutions). Institution(s) (Department, Faculty, University, City, State, Country) of each author (in Portuguese if authors are from Brazil).

Organization of the Manuscript

Example:

A.S. Aguiar¹, A.R. Melgarejo¹, C.R. Alves² and S. Giovanni-De-Simone^{2,3}

¹Divisão de Animais Peçonhentos, Instituto Vital Brazil, Niterói, RJ, Brasil

²Laboratório de Microsequenciamento de Proteínas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

Abstract

Since abstracts are published separately by Information Services, they should contain sufficient hard data, to be appreciated by the reader. The Brazilian Journal publishes unstructured abstracts in a single paragraph. The abstract should not exceed 250 words.

The abstract should briefly and clearly present the objective, experimental approach, new results as quantitative data if possible, and conclusions. It should mention the techniques used without going into methodological detail and mention the most important results.

Abbreviations should be kept to a minimum and should be defined in both the Abstract and text.

Please do not include any reference citations in the abstract. If the use of a reference is unavoidable, the full citation should be given within the abstract.

Please see <http://www.bjournal.com.br/writing_a_good_abstract.html> for suggestions on writing a good abstract

Key Words

A list of key words or indexing terms (no more than 6) should be included. A capital letter should be used for the first letter of each key word, separated by a semicolon. The Journal recommends the use of medical subject headings of Index Medicus for key words to avoid the use of several synonyms as entry terms in the index for different papers on the same subject. Remember, key words are used by the Scielo Database (see <http://www.scie-lo.br/bjmr;articles/search/subject>) to index published articles.

Organization of the Manuscript

Running title

This short title, to be used as a page heading, should not exceed 60 letters and spaces.

Corresponding author

One of the authors should be designated as the corresponding author. It is the corresponding author's responsibility to ensure that the author list is accurate and complete. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all consortium members and affiliations should be listed in the Acknowledgments section.

Provide the name and email address of the author to whom correspondence should be sent.

Introduction

The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the Introduction, think of readers who are not experts in this field. This should state the purpose of the investigation and justification for undertaking the research and relationship to other work in the field. An extensive listing or review of the literature should not be used. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about what was achieved.

Material and Methods

Sufficient information should be provided in the text or by referring to papers in generally available journals to permit the work to be repeated.

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. We encourage authors to submit, as separate files, detailed protocols for newer or less well-established methods. These will be linked to the article and will be fully accessible.

Results

The results should be presented clearly and concisely. Tables and figures should be used only when necessary for effective comprehension of the data. The Results section should provide results of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper. There is no specific word limit for this section, but a description of experiments that are peripheral to the main message of the article and that detract from the focus of

Organization of the Manuscript

the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. Large datasets, including raw data, should be submitted as supplementary files; these are published online linked to the article. The Results section should be written in past tense. In some situations, it may be desirable to combine Results and Discussion into a single section.

Discussion

The purpose of the Discussion is to identify new and relevant results and relate them to existing knowledge. Information given elsewhere in the text, especially in Results, may be cited but all of the results should not be repeated in detail in the Discussion. The Discussion should spell out the major conclusions and interpretations of the work including some explanation of the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done? The Discussion should be concise and tightly argued. If warranted, the Results and Discussion may be combined into one section.

Acknowledgments

When appropriate, briefly acknowledge technical assistance, advice and contributions from colleagues. People who contributed to the work, but do not fit the criteria for authors should be listed in the Acknowledgments section, along with their contributions. Donations of animals, cells, or reagents should also be acknowledged. You must also ensure that any-one named in the Acknowledgments agrees to being so named. Financial support for the re-search and fellowships should be acknowledged in this section (agency and grant number).

Figures

Figures must be submitted in high-resolution version (600 dpi). Please ensure that the files conform to our Guidelines for Figure Preparation when preparing your figures for production.

Preparing figure files for submission

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research encourages authors to use figures where this will increase the clarity of an article. The use of color figures in articles is free of charge. The following guidelines must be observed when preparing figures. Failure to do so is likely to delay acceptance and publication of the article.

Organization of the Manuscript

- Each figure of a manuscript should be submitted as a single file.
- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order.
- Figure titles and legends should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.
- The aim of the figure legend should be to describe the key messages of the figure, but the figure should also be discussed in the text.
- An enlarged version of the figure and its full legend will often be viewed in a separate window online, and it should be possible for a reader to understand the figure without moving back and forth between this window and the relevant parts of the text.
- Each legend should have a concise title of no more than 15 words. The legend itself should be succinct, while still explaining all symbols and abbreviations. Avoid lengthy descriptions of methods. Statistical information should be given as well as the statistical tests used.
- Arrows or letters should be used in the figure and explained in the legend to identify important structures.
- Figures with multiple panels should use capital letters A, B, C, etc. to identify the panels.
- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements, when the accepted manuscript is prepared for publication. For more information on individual figure file formats
- Individual figure files should not exceed 5 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously been published elsewhere. In order for all figures to be open-access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non-open-access journals. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

Organization of the Manuscript

Supported file type

The following file format can be accepted: TIFF (suitable for images) – with 600 dpi.

Micrographs should be treated like photographs with the following additional guidelines

- Electron micrographs must contain a magnification bar with its equivalence in micrometers. This information can be found on all micrographs together with the magnification size.
- Details of any stains used and the method of preparation the sample should be given in the figure legend or in the Material and Methods section.
- Detailed information about the microscope used should be included in the Material and Methods section.
- The type of camera, photographic software and details of any subsequent image manipulation should be included in the Material and Methods section.

Tables

- Tables must be submitted in Word (.doc) or Excel (.xls), not as an image.
- Tables must be numbered consecutively with Arabic numerals in the text.
- All explanatory information should be given in a footnote below the table.
- All abbreviations must be defined in this footnote, even if they are explained in the text.
- Tables must be understandable without referring to the text.
- Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible.
- Vertical and diagonal lines should not be used in tables; instead, indentation and vertical or horizontal space should be used to group data.
- Tables in Excel must be cell-based; do not use picture elements, text boxes, tabs, or returns in tables.

Organization of the Manuscript

References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Meeting abstracts, conference talks, or papers that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only. All personal communications should be supported by a letter from the relevant authors. Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. When possible, references which are easily available in English should be cited.

The BJMBR uses the numbered citation (citation-sequence) method. References are listed and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in parentheses. Multiple citations within a single set of parentheses should be separated by commas without a space (1,5,7). Where there are 3 or more sequential citations, they should be given as a range (4-9).

Because all references will be linked electronically (doi), if possible, to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial. For all references, **list the first 6 authors followed by et al.**, Title of article, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages, The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). Use the Medline journal abbreviations and follow the reference style shown on the Website noted above, with several exceptions. See below for details.

Please use the following style for the reference list:

Published Papers. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation in italics), Year, Volume, Complete Pages.

Lammers AE, Hislop AA, Flynn Y, Haworth SG. The 6-minute walk test: normal values for children of 4-11 years of age. Arch Dis Child 2008; 93: 464-468. Zhang Q, Malik P, Pandey D, Gupta S, Jagnandan D, Belin de CE, et al. Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase. Arterio-scler Thromb Vasc Biol 2008; 28: 1627-1633.

Article accepted for publication but not yet published. First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year of expected publication, (in press) at the end of the citation.

Organization of the Manuscript

Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CXC, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005 (in press).

Internet Communication. Ensure that URLs are active and available. Provide DOI, if available.

Developmental toxicology. <http://www.devtox.org/nomenclature/organ.php>. Accessed April 10, 2015.

CAPES Statistics. <http://www.capes.gov.br/capes/portal>. Accessed March 16, 2006.

CNPq Plataforma Lattes, "Investimentos do CNPq em CT&I".<http://fomentonacional.cnpq.br/dmfomento/home/index.jsp>. Accessed March 16, 2006.

Audiovisual Material.

Physician's Desk Reference (PDR). Release 2003.1AX. [CD-ROM]. Montvale: Thomson PDR; 2003.

Computer Program

Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. Epi info, version 6.04: a word processing database and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers. [Computer program]. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention; 1998.

Book, Whole. Authors, Book title, Edition, City, Publisher, Year.

American College of Sports Medicine. Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.

Book, Chapter. Authors, Chapter Title, Editors, Book title, Edition, City, Publisher, Year, Pages of citation.

Organization of the Manuscript

Kronfol A. Behavioral effects of cytokines: a psychiatrist's perspective. In: Plot-nikoff NP, Faith RE, Murgu AJ, Good RA (Editors), Cytokines, stress and immunity. London: CRC Press; 2007. p 1-16.

Kintzios SE. What do we know about cancer and its therapy? In: Kintzios SE, Barberaki MG (Editors), Plants that fight cancer. New York: CRC Press; 2004. p 1-14.

Report

WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). Environmental health criteria: 118 Inorganic mercury. Geneva: World Health Organization; 1991.

National Commission on Sleep Disorders Research. Wake up America: a national sleep alert. Washington: Government Printing Office; 1993.

National Heart Lung and Blood Institute. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention: NHLBI/WHO Work-shop Report. Bethesda: National Institute of Health. National Heart, Lung and Blood Institute publication No. 02-3659; 2006.

Thesis

Joselevitch C. Visão no ultravioleta em *Carassius auratus* (Ostariophysi, Cypri-formes, Cyprinidae): estudo eletrofisiológico do sistema cone - células hori-zontais. [Master's thesis]. São Paulo: Instituto de Psicologia, USP; 1999.

Conference, Symposium Proceedings. Cite papers only from published proceedings.

Hejzlar RM, Diogo PA. The use of water quality modelling for optimising operation of a drinking water reservoir. Proceedings of the International Conference Fluid Mechanics and Hydrology. 1999 Jun 23-26; Prague. Prague: Institute of Hydrodynamics AS CR; 1999. p 475-482.

“Unpublished results”, “Personal communication” and “Submitted papers”. Reference should appear in the text with the individual name(s) and initials and not in the reference list. (Santos CS, da-Silva GB, Martins LT, unpublished results). It is assumed that the author has obtained permission from the source when “personal communication” is cited.

How to submit a manuscript to the BJMBR

Author Instructions

Please make sure you have read through these instructions carefully before beginning the submission process.

Please go to www.bjournal.com.br at the right-hand corner of the home page and click on SUBMIT A MANUSCRIPT and follow the directions. If you need further assistance, please contact the Journal Staff directly (bjournal@terra.com.br). Manuscript preparation instructions can be found at <http://www.bjournal.com.br>.

Submission Process

The seven steps of the submission process are: Type, Title & Abstract; Attributes; Authors & Institutions; Recommended reviewers; Details & Comments; File upload; Review & Submit. The steps each contain sub-steps that can be accessed by clicking on their respective tabs.

Copyright

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research (BJMBR) applies the Creative Commons Attribution License (CCAL) to all works published (read the human-readable summary or the full license legal code). Under the CCAL, authors retain ownership of the copyright for their article and can allow anyone to download, reuse, reprint, modify, distribute, and/or copy articles published in the BJMBR, as long as the original.