

ARTIGO ORIGINAL

Interleucina 6 Participa dos Ajustes Metabólicos Desencadeados na Fase Aguda da Imobilização Articular - Estudo em Ratos.

Carlos Alberto da Silva ¹, Marcial Zanelli de Souza ², Eliete Luciano ³, Luciano Julio Chingui ⁴.

Professor Doutor na Universidade Metodista de Piracicaba. Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia - UNIMEP - Piracicaba - S.P - Brasil ¹

Correspondência para: casilva@unimep.br

Curso de Fisioterapia - UNIMEP - Piracicaba - S.P - Brasil ²

Departamento de Educação Física - UNESP - Rio Claro - S.P - Brasil ³

Faculdades Anhanguera - Piracicaba - S.P - Brasil ⁴

Resumo

Introdução/objectivo: Este estudo avaliou a participação da interleucina 6 (IL6) sobre parâmetros fisiológicos da musculatura esquelética de ratos nos três primeiros dias de imobilização articular da tibio-társica na posição de 90° (I). **Metodologia:** Ratos Wistar foram divididos em 4 grupos experimentais com n=6 e denominados: Controle, imobilizado 1 (I1), 2 (I2) e 3 dias (I3). Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/Kg, ip) e o sangue coletado para avaliação da concentração plasmática de ácidos gordos livres (AGL) e IL6. Os músculos esqueléticos solhar (S) e gêmeos (G) foram utilizados para avaliação das reservas de glicogénio (GLI) e a relação DNA/proteínas totais (DNA/PT). Para a análise estatística dos dados, inicialmente, foi aplicado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e o teste de homocedasticidade (critério de Bartlett). Posteriormente, foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($p < 0,05$). **Resultados/Discussão:** No I1 o S não apresentou modificação no GLI, no entanto, G apresentou redução de 20%. No I2 e I3 houve redução no GLI (S; 40 e 60%, e GB; 33 e 56% respectivamente) e elevação na IL6 (266% maiores em I1, estabilizado em valores médios 246% em I2 e I3), acompanhado pela elevação no AGL (107%, 35% e 16% respectivamente no 1º, 2º e 3º dia da imobilização). No que se refere à relação DNA/PT, G apresentou redução (27% e 30% em I2 e I3). Os resultados sugerem que a interleucina 6 é uma citocina secretada nas fases iniciais do desuso muscular, e exerce um importante papel no processo de hipotrofia induzida pela imobilização. **Conclusões:** A IL6 pode ter a função de promover ajustes metabólicos que permitam minimizar as alterações químico-metabólicas que acompanham o desenvolvimento da hipotrofia.

Palavras chave: Interleucina, Músculo esquelético, Imobilização, Atrofia muscular.

Abstract

Introduction/Objective: This study evaluates the participation of interleukin-6 (IL6) on physiological parameters of skeletal musculature of rats during the first three days of ankle joint immobilization at 90° (I). **Methodology:** Wistar male rats were divided into 4 groups (n=6): Control, immobilized with acrylic resin orthosis 1 (I1), 2 (I2) and 3 days (I3). The rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50mg/Kg, ip) and a blood collected for evaluation of the plasmatic concentrations of free fatty acids (FFA) and IL6. The soleus muscle (S) and the gastrocnemius muscle (G) were used for evaluation of the glycogen reserves (GLY) and the total DNA/protein rate (DNA/PT). In the statistical analysis we used the test of Kolmogorov-Smirnov and homocedasticidade test by Bartlett criteria. After that, we used ANOVA and Tukey teste, $p < 0,05$. **Results/Discussion:** In I1, S didn't present modification in GLY but G presented a reduction (20%). In I2 and I3 there was reduction in GLY (S 40 and 60%; G 33 and 56%, respectively) and elevation of IL6 (266% greater in the I1 and stabilizing at average values 246% larger in I2 and I3) accompanied by a rise in FFA (107%, 35% and 16% respectively in the 1st, 2nd and 3rd day of I). In relationship DNA/PT, G presents a reduction (27% and 30% smaller in I2 and I3). The results suggest that IL6 is a cytokine secreted in the initial phases of muscular disuse, occupying an important role in the hypotrophy process induced by the immobilization. **Conclusion:** The IL6 could have a function of promoting metabolic adjustments that allow for minimization of chemical and metabolic alterations which accompany the hypotrophy.

Key words: Interleukin, Skeletal muscle, Immobilization, muscle atrophy.

Introdução

A homeostasia metabólica das fibras musculares depende de um constante suprimento de substratos metabolizáveis que ajusta constantemente a

disponibilidade às necessidades fisiológicas. Neste sentido, as dinâmicas que determinam o padrão funcional podem ser comprometidas por diferentes factores, como por exemplo, bloqueio da junção neuromuscular, desnervação ou ainda pelo desuso

(Kannus et al, 1998). Em especial no que se refere à imobilização muscular, tem sido observado hipotrofia em associação com alterações ortopédicas como na osteoartrite crónica, no tratamento de fracturas, hipogravidade, em situações de manutenção por longos períodos na cama por razões médicas ou cirúrgicas ou ainda frente a lesões classicamente observadas no meio desportivo (Desplanches et al, 1990; Reardon et al, 2001).

Concomitante ao desuso muscular crónico, observa-se instalação de resistência à insulina, facto que potencializa o estado catabólico, a geração de fibrose intramuscular, redução da extensibilidade muscular além de limitação da liberdade de movimento articular (Ploug et al, 1987; Reardon et al, 2001). Apesar de o desuso muscular crónico e da imobilização serem condições que modificam o perfil metabólico, as dinâmicas acivadas por estas condições ainda não são totalmente conhecidas, porém, há indícios de que as alterações mais relevantes da hipotrofia possam ocorrer nos dias iniciais da imobilização (Hirose et al, 2000).

Diversos autores procuram caracterizar a hipotrofia. Assim há consenso de que pode haver um carácter comportamental específico para cada tipo de músculo. Dessa maneira as fibras do tipo I possuem menor adaptação em relação às fibras do tipo II, por isso, são mais afectadas pelo desuso (Talmadge, 2002). Na década de 90 foi sugerido que músculos cuja acção é anti-gravitacional possuem maior grau de hipotrofia em situações de desuso (Caiozzo et al, 1996). Observações mais recentes pontuaram maior susceptibilidade à hipotrofia em fibras lentas oxidativas (Tanaka et al., 2004). Dessa maneira, destaca-se o facto de que o músculo solhar foi o mais comprometido em situações de desuso por ser predominantemente formado por fibras do tipo I, ao passo que o extensor comum dos dedos que possui predomínio de fibras do tipo II é menos comprometido (Kasper, 2002, Tanaka et al, 2004).

Nesse contexto, também tem sido observado que as fibras lentas em situação de desuso apresentam marcantes alterações histo-fisiológicas como irregularidades no reticulo sarcoplasmático, fibrilas desintegradas, lesão mitocondrial, linhas Z estendidas, com condensação e fragmentação da cromatina nuclear e redução de sarcômeros em paralelo (Lu et al, 1997). Alguns estudos têm tentado elucidar as alterações metabólicas decorrentes da imobilização. Hilder et al, (2003), estudaram o método de imobilização através da suspensão de membros posteriores de ratos e demonstraram que em músculos esqueléticos de contração lenta, como o músculo solhar, a resistência à

insulina acompanha o processo de hipotrofia muscular induzida pelo desuso. Simultaneamente, esses autores observaram também uma redução na expressão de proteínas nos músculos hipotrofiados correlacionaram-na com a redução na efectividade da proteína IRS-1, outro factor importante observado foi a redução na actividade da enzima Akt, facto que indica alterações nas vias citosólicas responsáveis pela glicogénese e também pela glicólise. Essas observações evidenciam o comprometimento na sinalização insulínica, e consequentemente elucidam parte dos mecanismos inerentes ao processo de hipotrofia.

Outro factor que possivelmente esteja ligado aos mecanismos hipotróficos é a formação de citocinas, que são proteínas de baixo peso molecular, as quais actuam de forma autócrina, parácrina e endócrina e modulam várias funções celulares. Dentre as citocinas, a interleucina 6 (IL-6) merece destaque devido à sua actividade pró e inflamatória (Maldoveanu et al, 2001; Jawa et al, 2006). A IL-6 está entre os mediadores mais potentes da resposta aguda ao trauma, ela participa de uma cascata de reacções que inicia com o dano tecidual e que objectiva, em última instância, a restauração do tecido (Crane & Miller, 1983). Estudos que focalizaram fenómenos ocorrentes em situações catabólicas, evidenciaram elevação na concentração plasmática de IL-6 (Benedetti et al, 1997). Nos músculos esqueléticos, a IL-6 tem sido relacionada à proteólise muscular evidenciada clinicamente pela hipotrofia muscular. Lieskovska et al (2002) relataram que ratos transgênicos para a IL-6 apresentaram hipotrofia muscular que foi inibida por anticorpos anti-receptor desta citocina, já que a IL-6 pode mediar à actividade do sistema proteolítico lisosomal. Sua participação na proteólise muscular tem sido estudada por diferentes pesquisadores, indicando que a IL-6 também pode interferir no eixo GH/IGF-I.

Diante desse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a concentração plasmática de interleucina 6, o conteúdo de glicogénio dos músculos solhar e gémeos porção branca, a concentração plasmática de ácidos gordos livres e a relação proteína total/DNA em ratos submetidos à imobilização articular de membro posterior na posição tibio-társica em 90°, esse trabalho enfatizou os primeiros três dias do desuso.

Metodologia

Foram utilizados ratos albinos *Wistar* com 3 meses de idade, fornecidos pelo Biotério da UNESP – Rio Claro, SP, Brasil, alimentados com ração (Purina® para

roedores) e água *ad libitum*, submetidos a ciclos foto periódicos de 12h claro/escuro e distribuídos em 4 grupos experimentais com n=6, a saber: controle (C) e imobilizados 1 dia (I1), imobilizados 2 dias (I2) e imobilizados 3 dias (I3).

Após anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg,i.p), a pata posterior esquerda dos animais foi imobilizada com o modelo de ortótese de resina acrílica proposto por Silva et al. (2006) como pode ser observado na figura 1. Após o período de imobilização os animais foram novamente anestesiados e duas amostras de sangue foram colectadas da veia renal, uma das amostras foi direccionada à extração do soro para avaliação da concentração plasmática de interleucina 6 pelo método ELISA (Kit R&D Systems, Minneapolis, MN) e a outra foi centrifugada e o plasma

isolado para determinação da concentração plasmática de ácidos gordos livres através de kit de uso laboratorial (NEFA C; Wako, Richmond, VA). A seguir, os músculos solhar e o gêmeo porção branca, foram cuidadosamente retirados e encaminhados para avaliação das reservas glicogénicas pelo método proposto por Siu et al, (1970), da concentração de proteína total através de kit laboratorial da marca Bio Diagnóstica® e quantidade de DNA segundo o método proposto por Giles & Myers (1965).

Para a análise estatística dos dados, inicialmente, foi aplicado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e o teste de homocedasticidade (critério de Bartlett). Posteriormente, foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($p < 0,05$).

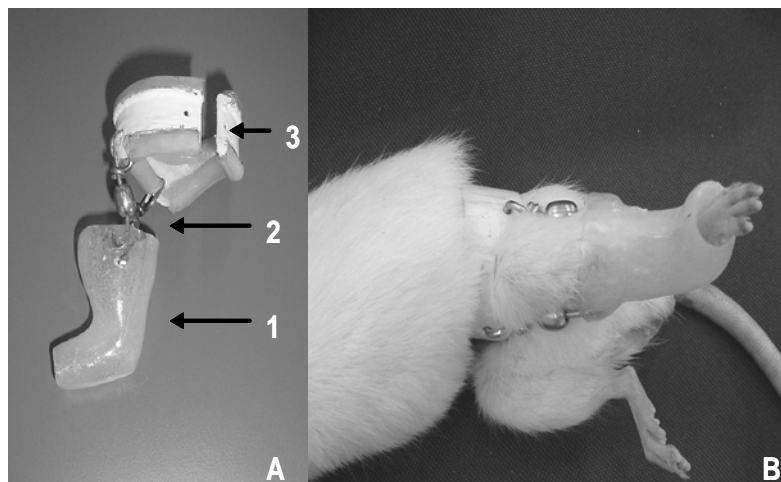


Figura 1 – Em (A) observa-se a ortótese de resina acrílica composta de uma bota de acrílico (1), rotadores (2) e cinta abdominal (3). Em (B) pode-se observar a ortótese adaptada ao corpo do rato mantendo a articulação do tibio-társica na posição de 90°.

Resultados

Um consenso na literatura científica é que a reserva muscular de glicogénio é imprescindível para a manutenção de condições energéticas ideais, pois determina a eficiência da contração muscular. Inicialmente foi avaliado o comportamento das reservas glicogénicas do músculo solhar (fibra tipo I). Foi observado que nas primeiras 24 horas de desuso, não houve diferença entre os grupos controle e imobilizado (figura 2).

Por outro lado, houve redução significativa das reservas glicogénicas no segundo e terceiro dia da imobilização, após 48h de imobilização houve redução de 40% nas reservas, a redução foi ainda maior no grupo imobilizado durante 3 dias, onde foi observado redução de 60% ($p < 0,05$).

No que se refere ao comportamento da reserva glicogénica do músculo gêmeo (fibra tipo II) pode-se observar na figura 2 que, nas primeiras 24 horas houve redução de 20% ao passo que no segundo e terceiro dia, a redução foi contínua e progressiva e atingiu 33%.

Na continuidade da proposta, passou-se à avaliação da concentração plasmática de interleucina 6 (figura 3), e foi observado uma elevação significativa de 166% logo nas primeiras 24h do desuso ($p < 0,05$). No segundo e terceiro dia da imobilização as concentrações plasmáticas estabilizaram-se em valores médios 146% maiores quando comparadas ao controle ($p < 0,05$). Ao verificar-se a expressiva elevação na concentração plasmática de IL6, passou-se a avaliar a concentração plasmática de ácidos gordos livres e foi observado que houve elevação de 107% nas primeiras 24h do

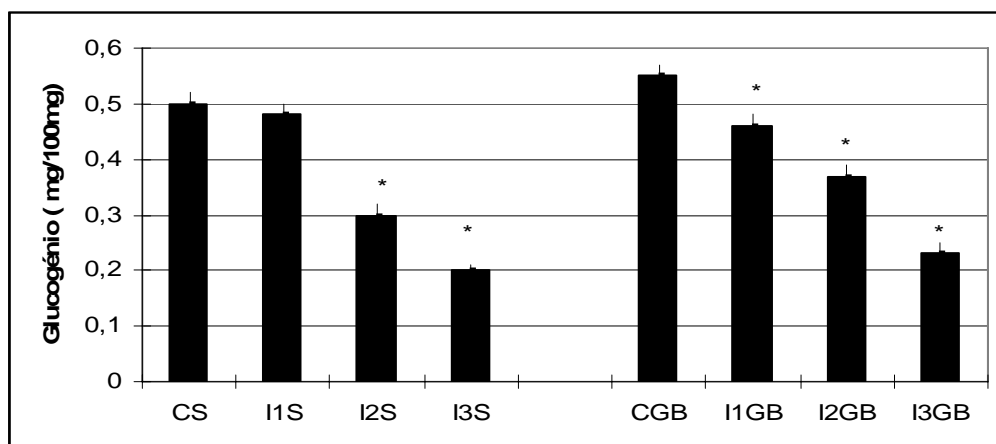


Figura 2. Valor da média±epm do conteúdo de glicogénio (mg/100mg) dos músculos solhar (S) e gêmeo porção branca (GB) dos grupos controle (C) e imobilizados 1 dia (I1), 2 dias (I2) e 3 dias (I3) na posição tibio-társica 90°, n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

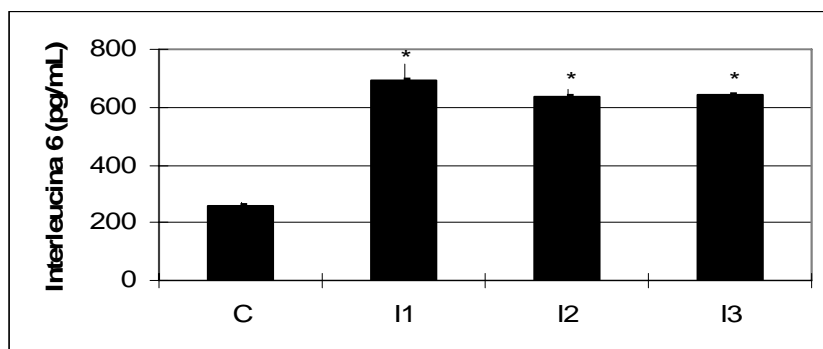


Figura 3. Valor da média±epm da concentração plasmática de interleucina 6 (pg/mL) dos grupos controle (C) e imobilizados 1 dia (I1), 2 dias (I2) e 3 dias (I3) na posição tibio-társica de 90°, n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

desuso (p<0,05). No segundo dia do desuso, a concentração plasmática ainda permanecia elevada e atingiu valores 31% maiores que o controle. No terceiro dia ainda apresentava valores 16% maiores, como mostra a figura 4.

A seguir, passou-se a avaliar a razão proteína total/DNA nos diferentes grupos experimentais e como pode ser observado na tabela 2 houve redução somente no músculo gêmeo branco no segundo e terceiro dia do desuso como mostra a tabela 1.

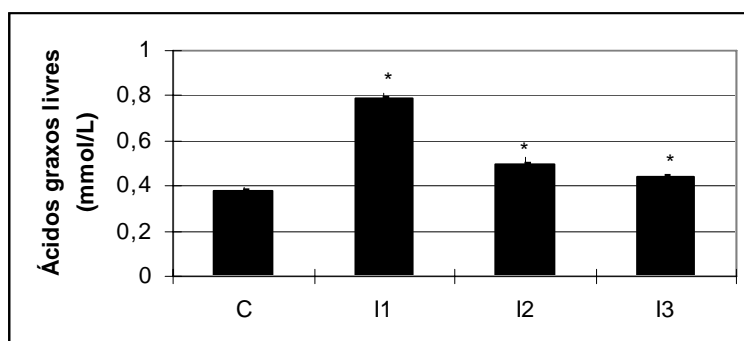


Figura 4. Valor da média±epm da concentração plasmática de ácidos gordos livres (mmol/L) dos grupos controle (C) e imobilizados 1 dia (I1), 2 dias (I2) e 3 dias (I3), n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

Tabela 1. Razão Proteínas totais/DNA (mg/100mg) nos músculos solhar e gêmeos dos animais controles e submetidos à imobilização (I) por 1, 2 e 3 dias (média \pm epm, n=6).

	Controles	I 1 dia	I 2 dias	I 3 dias
Solhar	137,82 \pm 14,5	116,03 \pm 3,86	105,84 \pm 11,6	106,21 \pm 18,07
Gêmeos	181,04 \pm 9,79	146,85 \pm 13,84	131,55 \pm 15,5*	125,84 \pm 17,2*

* Diferente de controles (p<0,05)

Discussão

O músculo esquelético é um dos principais tecidos ligados ao controle glicémico por apresentar mecanismos responsáveis pela captação, metabolização e reserva de glicose. Esta capacidade decorre da expressão génica de transportadores do tipo 1 (GLUT1) envolvidos na captação basal da glicose e transportadores do tipo 4 (GLUT4) cuja actividade mostra ser dependente da insulina e do aumento na actividade contrátil (Fernandez & Leroith, 2005). Cerca de 70 a 85% da glicose captada é direccionada à formação de reservatórios de glicogénio ou pode ainda ser oxidada para geração de energia (Henriksen et al, 1990). Neste aspecto, destaca-se que as reservas musculares de glicogénio são uma importante fonte de energia durante a actividade contrátil. Desta forma, flutuações no seu conteúdo, podem interferir no desempenho muscular, ou seja, concomitante à elevação nas reservas glicogénicas observa-se melhora na resistência muscular durante actividade física, porém, pequenas quantidades de glicogénio estão associadas a situações de fadiga muscular (Sesti, 2006).

Hirose et al. (2000) estudaram a via sinalizadora da insulina em ratos que tiveram a pata imobilizada por fixação do Joelho e tornozelo à 90°, durante sete dias, e verificaram redução na transdução do sinal insulínico, esses factos indicam défice na activação do receptor e nas enzimas activadas a partir deste, inclusive a fosforilação do IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina) e a activação da PI3-K. Esses dados demonstram que o quadro de resistência à insulina, também pode ser desencadeado na imobilização. Essa alteração na dinâmica de sinalização da insulina pode explicar os resultados deste estudo, onde foi observado que sob condição aguda de imobilização, houve redução nas reservas musculares de glicogénio.

Este estudo mostra que no músculo solhar, houve redução significativa no conteúdo de glicogénio somente a partir do segundo dia do desuso. Neste sentido, Ploug et al. (1995) ao estudarem o comportamento metabólico de músculos vermelhos

submetidos a um curto período de imobilização (48 horas) verificaram redução significativa na população dos transportadores GLUT1 e GLUT4 além da redução na actividade das vias glicogénicas e sugeriram o desenvolvimento do quadro de resistência no desuso. Ainda em relação às reservas musculares de glicogénio, o nosso estudo demonstra que no músculo gêmeo branco (fibra tipo II), houve a maior redução no conteúdo quando comparado ao solhar (fibras tipo I). Neste sentido, temos a considerar que a ortótese permitia a descarga de peso no membro imobilizado e este fato pode ter contribuído para a diferenciação do efeito se comparado ao músculo solhar, uma vez que é um músculo postural. Assim, os dados deste trabalho corroboram com a literatura e rectificam que a ortótese aqui utilizada como modelo de imobilização mostrou ser um modelo gerador de resistência à insulina à partir do comprometimento da homeostasia das vias metabólicas musculares.

Entre os anos 70 e 80, havia contradição quanto ao tipo de fibras mais susceptíveis à hipotrofia, foi descrito que as fibras brancas (tipo II) eram mais susceptíveis enquanto outros autores referiram-se às fibras vermelhas (tipo I) como as mais susceptíveis. No entanto, há trabalhos que não evidenciaram qualquer diferença no comportamento dos diferentes tipos de fibras à hipotrofia (McDougall et al, 1980). Em consenso tem-se verificado que o decréscimo mais pronunciado do diâmetro das fibras ocorre durante a primeira semana de imobilização e em estudos realizados com animais e com tempos de imobilização variáveis, foi demonstrado que as fibras tipo I são as que apresentam sinais mais evidentes de hipotrofia, essas ponderações demonstram que tal facto ocorra devido à redução da actividade das enzimas oxidativas. Neste sentido, os diferentes trabalhos diferenciam-se quanto ao período de desuso. Contudo, os resultados deste estudo mostram que já existem alterações significativas desencadeadas precocemente, ou seja, nos primeiros dias do desuso. Cabe salientar que a homeostasia energética do músculo gêmeo branco já ficou comprometida nos primeiros dias da imobilização.

A escolha de direccionar o estudo à posição tíbio-társica à 90°, se deve ao facto de ser a posição anatómica mais utilizada na clínica e também há trabalhos que mantiveram a imobilização tíbio-társica na posição de 90°, juntamente com a imobilização das articulações do joelho e anca, o que diferencia de nossa proposta onde a articulação do joelho e anca mantém-se livres (Ploug et al, 1995; Hirose et al, 2000). Dentro destas considerações, a órtese foi capaz de promover na musculatura, alterações metabólicas e na taxa proteína total/DNA e indicar o desenvolvimento de proteólise, uma vez que, esta relação serve como índices de tamanho celular (Albanes et al, 1990).

Recentemente foi estudada a inatividade muscular em membros posteriores de ratos com observações de que o músculo solhar sofre hipotrofia em relação ao longo extensor dos dedos, provavelmente isto tem relação com o tipo de fibra e função muscular durante a condição normal de descarga de peso. Tanaka et al. (2004) também associaram o tipo de fibras ao grau de hipotrofia muscular, sabendo-se que o solhar possui maior número de fibras tipo I e o extensor longo dos dedos mais fibras do tipo II, o primeiro músculo sofre mais durante a imobilização, devido à menor solicitação das fibras posturais (Ploug et al, 1995).

Dentro desta linha de raciocínio, observou-se que o músculo gêmeo branco foi o mais afectado pela imobilização e possivelmente se deve ao facto de ser bi-articular e neste modelo de desuso, apresenta limitação na sua condição fisiológica. Assim, por haver descarga de peso, o músculo solhar recebia estímulo constante enquanto o animal deambulava. Uma vez que, tem sido descrito que frente à elevação da actividade contrátil há elevação na captação de glicose decorrente da translocação de transportadores GLUT 4, é sugestivo o facto que o solhar adquiriu um status energético diferenciado dos outros músculos, razão pela qual os dados diferem do consenso presente na literatura.

Além das reservas energéticas, a relação proteína total/DNA muscular também foi comprometida pela imobilização do membro, a alteração dessa relação foi significativa a partir do 2º dia e com especificidade no músculo gêmeo branco, essa observação reitera que dentro da especificidade deste modelo de imobilização as fibras brancas são afectadas precocemente.

No que se refere às relações entre a homeostasia do músculo esquelético e as citocinas, é sabido que há elevação na produção de citocinas pro-inflamatórias, em especial a IL-6, associado à lesão tecidual, como já observado em actividade física de alta intensidade (Keller et al, 2001, Pedersen et al, 2004; 2007). Nesse sentido, os resultados deste trabalho revelam que na

fase inicial da imobilização há uma expressiva elevação na concentração plasmática da IL-6, isso pode estar associado à diferentes factores ligados à imobilização, como por exemplo o desenvolvimento de lesão nas fibras musculares.

Dentro do perfil metabólico, foi observado que a imobilização promove uma expressiva redução na reserva de glicogénio, facto relacionado à redução na actividade da cascata sinalizadora da insulina, por outro lado, se deve considerar que concomitante à redução nas reservas de glicogénio a níveis que comprometam a geração de energia e afectam a actividade contrátil, tem sido descrito elevação na liberação de IL-6 pelo tecido muscular (Pedersen & Febraio, 2005; Pedersen & Fischer, 2007). Esses eventos justificam estes resultados onde foi observado elevação na concentração plasmática de IL-6 concomitante a imobilização.

No músculo imobilizado foi observado redução no peso e redução na razão proteína total/DNA, estas observações demonstram que há instalação de um estado catabólico que se intensifica após 48h do desuso. Vale salientar que a IL-6 direta ou indiretamente intermedia estados catabólicos (Bodell et al, 2008).

Diversos autores estudaram as relações entre a concentração plasmática de IL-6 e o exercício físico; e sugeriram que a elevação pronunciada na concentração plasmática de IL-6 pode estar associada à lipólise (Wallenius et al, 2002; Pedersen & Febbraio, 2005). Neste sentido, observamos que frente à imobilização, houve elevação significativa na concentração plasmática de ácidos graxos livres durante a flutuação da concentração plasmática da IL-6, esse evento indica que pode haver integração nas relações funcionais, e sugere que a IL-6 possa participar do controle de vias metabólicas e promove melhoria da disponibilidade de substratos metabolizáveis (Pedersen et al, 2003).

Este estudo é pioneiro em demonstrar acções da interleucina-6 na fase inicial da imobilização sendo sugestivo novos estudos que abordem diferentes tempos e posições da imobilização articular, bem como a avaliação de protocolos da prática fisioterapêutica aplicados precocemente ao início do desuso. Ressalta-se ainda, o facto da IL-6 promover síntese protéica e activar a formação de factores de crescimento insulínicos (Gleeson, 2000). Estas acções podem fazer parte de um conjunto de sistemas precocemente activados e envolvidos na reparação tecidual.

Conclusão

A fase inicial da imobilização muscular é acompanhada de elevação na produção e secreção de interleucina 6, a

qual promove mobilização das reservas energéticas e assim dá suporte nutricional aos processos de reparação ou regeneração tecidulares. Dessa maneira, temos que destacar que estas respostas fisiológicas são precocemente activadas, ou seja, ocorrem enquanto o processo de hipotrofia se instala.

Bibliografia

- Albanes D, Salbe A.D, Levander A.O, Taylor P.R, Nixon D.W, Winick M. The effect of early caloric restriction on colonic cellular growth in rats. *Nutr Cancer* 1990;13 (1-2):73-80.
- Benedetti F, Alonzi T., Moreta A., Lazzaro D., Costa P., Poli V., Marini A., Ciliberto G., Fattori E. Interleukin-6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. *J Clin Invest.* 1997, 99: 643-650.
- Bodel P.W, Kodesh E, Haddad F, Zaldivar F.P, Cooper D.M., Adams G.R. Skeletal muscle growth in young rats is inhibited by chronic exposure to IL-6 but preserved by concurrent voluntary endurance exercise. *J. Appl Physiol*, 2008, 90831-90840.
- Caiozzo V.J, Haddad F, Baker M.J, Henrick R.E, Pritto N, Baldwin K.M. Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1996, 81(1):123-32.
- Crane L.J. & Miller D.L. Plasma protein induction by isolated hepatocytes. *Mol Cell Biochem*. 1983, 53: 89-109.
- Desplanches D.; Kayar S. R.; Sempore B; Flandrois R., Hoppeler, H. Rat soleus muscle ultrastructure after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol*. 1990, 69(2): 504 – 508.
- Fernandez A. M. & LeRoith D. Skeletal muscle. *Adv Exp Med Biol*. 567:117-47, 2005.
- Giles KW & Myers A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature*. 1965, 206(4979): 93-95.
- Gleeson M. Interleukins and exercise (perspectives). *J. Physiol*. 2000, 529:1-3.
- Hilder T.L, Tou J.C, Grindeland R.E, Wade C.E, Graves L.M. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle. *FEBS Lett*. 2003, 553: 63–67.
- Henriksen E.J, Bourney R.E., Rodnick K.J, Koranyi L., Permutt M.A., Holloszy J.O. Glucose transport protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1990, 259(6): 593-598.
- Hirose M., Kaneki M., Sugita H., Yasuhara S, Martyn J. A. Immobilization depress insulin signaling in skeletal muscle. *Am. J. Physiol*. 2000, 279(6) 1235-1241.
- Jawa RS, Kulaylat MN, Baumann H, Daytin MT. What is new in cytokine research related to trauma/critical care? *Intensive Care Med*. 2006, 21 (2):63-85.
- Kannus P., Jozsa L., Jarvinen T.L.N., Kvist M., Vieno T., Jarvinen T.A H., Natri A., Jarvinen M. Free mobilization an low to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J. Appl. Physiol*. 1998, 84(4): 1418-1424.
- Kasper CE, Talbot LA, Gaines JM. Skeletal muscle damage and recovery. *AACN Clin Issues* 2002, 13(2):237-247.
- Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Sltin B, Pedersen BK, Neufer PD. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *Faseb J*. 2001, 15:2748-2750.
- Lieskovska J., Guo D., Dermans S. IL-6-overexpression brings about growth impairment potentially through a GH receptor defect. *Growth Horm IGF Res*. 2002, 12: 388-398.
- Lu D.X, Huang S.K, Carlson B.M. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec*. 1997, 248(3):355-65.
- Maldoveanu A.I., Shepard R.J., Shek P.N. The cytokine response to physical activity and training. *Sports Med*. 2001, 3 (2):115-144.
- McDougall J.D., Elder G.C.B., Sale D.C., Moroz J.R., Sutton J.R. Effects of strength training and immobilization on human muscle fibers. *Eur. J. Appl. Physiol*. 1980, 43: 25-34.
- Pedersen B.K, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Plomgaard P, Febbraio M, Saltin B. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J. Muscle Res Cell Motil*. 2003, 24:113-119.
- Pedersen B.K, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Wolsk-Petersen E & Febbraio M. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc*. 2004, 63 (2): 263-267.
- Pedersen B.K & Febbraio M. Muscle-derived interleukin-6 – a possible link between skeletal muscle, adipose tissue, liver and brain. *Brain Behav Immun*. 2005, 19(5): 371-376.
- Pedersen B.K, Akerstrom T.C, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol*. 2007, 103 (3); 1093-1098.
- Pedersen B.K & Fischer C.P. Beneficial health effects of exercise – The role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci*. 2007, 28 (4): 152-156.
- Ploug T., Galbo H., Vinten J., Jorgensen M., Richter E. A. Kinetics of glucose transport in rat muscle: effects of insulin and contractions. *Am. J. Physiol*. 1987, 253: 12-20.
- Ploug T, Ohkuwa T, Handberg A, Vissing J, Galbo H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 1995, 268: 980-986.
- Reardon K.A., Fracp B.S., Davis J., Kapsa R.M.I., Choong P., Fracs M.D., Byrne, E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor Mynas are up-regulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle & Nerve*. 2001, 24: 893-899.

Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006, 20 (4): 665-679.

Silva C.A, Guirro R.R.J, Cancelliero K.M, Polacow M.L.O, Durigan J.L.Q. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2006, 39: 979-85.

Siu LO, Russeau J.C, Taylor A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol.* 1970, 28(2): 234-236.

Talmadge RJ. Mechanical properties of rat soleus after long-term spinal cord transection. *J Appl Physiol.* 2002, 93 (4): 1487-1497.

Tanaka T, Kariya Y, Hoshino Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. *J Orthop Sci.* 2004, 9:76-85.

Wallenius V, Wallenius K, Ahrén B, Rudling M, Carlsten H, Dickson S.L, Ohlson C, Jansson J.O. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med.* 2002, 8:75-79.