

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ENVOLVIMENTO MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE

Vivian de Oliveira Nunes Teixeira

Orientador: **Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier**

PORTO ALEGRE, janeiro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ENVOLVIMENTO MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE

Vivian de Oliveira Nunes Teixeira

Orientador: **Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier**

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciências Médicas.

Porto Alegre, janeiro de 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Teixeira, Vivian de Oliveira Nunes
ENVOLVIMENTO MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ARTRITE / Vivian de Oliveira Nunes Teixeira. -- 2012.
48 f.

Orientador: Ricardo Machado Xavier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. atrofia muscular. 2. artrite induzida por
colágeno. 3. locomoção debilitada. 4. proteólise. 5.
regeneração. I. Xavier, Ricardo Machado, orient. II.
Título.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ricardo Machado Xavier, por ter me aceito e orientado nesse trabalho.

À Lidiane Filippin, por ter me acompanhado e trabalhado comigo mesmo quando muito ocupada.

À Patrícia Oliveira, por ter me recebido tão bem no laboratório.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação animal, muito obrigada pela ajuda no manejo dos animais.

À Dra Marcelle, obrigada pela ajuda na análise das lâminas.

Aos demais colegas de laboratório, pelo apoio.

Aos amigos e familiares, sem quem eu não teria realizado nada.

OBRIGADO!!!

SUMÁRIO

1	RESUMO	6
2	ABSTRACT	7
3	ABREVIATURAS	8
4	INTRODUÇÃO	9
5	ARTIGO 1: MECANISMOS DE PERDA MUSCULAR DA SARCOPENIA	11
	RESUMO	12
	ABSTRACT	12
	INTRODUÇÃO	13
	SARCOPENIA	13
	MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA SARCOPENIA	14
	PERDA DE MASSA CELULAR	15
	PROTEÓLISE MUSCULAR	15
	Autofagia	16
	Proteases ativadas por Cálcio: Calpaína e Caspases	17
	Proteossomo	18
	CÉLULAS SATÉLITES	21
	SARCOPENIA NA ARTRITE REUMATOIDE	22
	CONCLUSÃO	23
	ADENDO	23
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
6	OBJETIVOS	28
	OBJETIVO GERAL	28
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO E DO ADENDO	29
7	ARTIGO 2: MUSCLE WASTING IN COLLAGEN INDUCED ARTHRITIS IS DIFFERENT FROM DISUSE ATROPHY	30
	ABSTRACT	31
	INTRODUCTION	32
	MATERIALS AND METHODS	33
	RESULTS	36
	DISCUSSION	37
	CONCLUSIONS	40
	AKNOWLEDGMENTS	41
	BIBLIOGRAFIC REFERENCES	41
	FIGURES AND TABLES	43
	SUPPLEMENTARY DATA	45
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
9	PERSPECTIVAS FUTURAS	48

1 RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica, inflamatória, sistêmica, com manifestações autoimunes articulares e extra-articulares, como fraqueza e atrofia muscular. Apesar de terem profundo impacto funcional, os mecanismos envolvidos nesses processos em músculo esquelético têm sido pouco estudados. O objetivo desse trabalho foi descrever o envolvimento muscular e vias moleculares em um modelo experimental de artrite e em um modelo de atrofia por desuso.

Ratas Wistar, 8-12 semanas foram separadas em três grupos: controle (CO), imobilizado com bota de cobre (IM) e artrite induzida por colágeno bovino tipo II (CIA). A locomoção espontânea e o peso dos animais foram avaliados semanalmente. As articulações tíbio-társicas e os músculos gastrocnêmicos foram processados e corados com hematoxilina-eosina (HE). Imunoblot foi realizado para quantificar MuRF-1, miogenina e anti-LC3. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

A análise histológica das articulações confirmou a severidade da doença. Na locomoção espontânea houve uma diferença significativa na distância, velocidade, número de vezes em pé e número de descanso com redução no grupo CIA, quando comparado ao grupo controle, de 90%, 90%, 75% e aumento de 70%, respectivamente. O peso corporal total, o peso do músculo gastrocnêmio, e o peso relativo do músculo reduziram 20%, 30% e 20% nos animais CIA, quando comparado ao grupo controle. A análise histopatológica identificou no músculo de CIA: atrofia de fibras perifasciculares, infiltrado inflamatório, fibras atroficas do tipo 2 e edema. A área seccional da miofibra estava reduzida em torno de 30% no grupo CIA e 60% no IM. Na quantificação proteína demonstrou aumento da expressão em 70% das proteínas MuRF-1 e miogenina no grupo CIA quando comparado ao grupo controle, resultado não observado em IM. Na quantificação da proteína LC3 não houve diferença entre os grupos.

Esse estudo demonstrou que o desenvolvimento da artrite experimental está associado com perda de peso e da mobilidade, atrofia muscular e degradação muscular nesses animais. Pela primeira vez foi demonstrado que a atrofia muscular na artrite está associada com a própria doença e não com a imobilidade, visto que o grupo IM, apesar de atrofia mais muscular mais marcada, não apresentou ativação das vias de atrofia (MuRF-1 e miogenina) que foram observadas no grupo CIA.

Palavras chave: atrofia muscular, artrite induzida por colágeno, locomoção debilitada, proteólise, regeneração.

2 ABSTRACT

Objective: Although causing great functional impact, the mechanisms of muscle wasting in RA have been poorly studied. The objective of this study is to describe the muscular involvement in an experimental model of arthritis and its pathways and compare with disuse atrophy.

Methods: Female Wistar rats were separated in three groups: control (CO), collagen-induced arthritis (CIA) and immobilized (IM). Spontaneous locomotion and weight were evaluated weekly. Gastrocnemius muscle was evaluated by histology and immunoblotting to measure LC3, MuRF-1 and myogenin expression. Significance was considered at $p < 0.05$ level.

Results: Histological analysis of the joint confirmed the severity of the arthropathy. There was significant difference in spontaneous locomotion (distance, velocity, number of times standing and number of times resting) in CIA group. Animal body weight, gastrocnemius muscle weight and relative muscle weight decreased 20%, 30% and 20% in CIA rats. Inflammatory infiltration, swelling and type 2 fiber atrophy was present in CIA gastrocnemius muscles, with reduced cross-sectional area by 30%, and 60% in IM. Immunoblotting analysis demonstrated increased expression of myogenin and MuRF-1 in CIA muscles by about 70%, while in IM remained similar to control.

Conclusions: This study demonstrated that the development of experimental arthritis is associated to decreased mobility, weight loss, muscle atrophy, increased expression of markers of muscle proteolysis and regeneration. For the first time it is demonstrated that muscle atrophy in arthritis is associated with the disease itself, and not simply due to decreased mobility, since immobilized group presented no activation of the same atrophy pathways.

Key words: muscle atrophy, collagen-induced arthritis, impaired locomotion, immobilization, regeneration.

3 ABREVIATURAS

AR – Artrite reumatoide
CIA – Artrite induzida por colágeno
CII – Colágeno do tipo II
CFA – Adjuvante completo de Freund
CO – controle
CS – Células satélites
DNA – Ácido Desoxiribonucléico
FoxO – Fator de transcrição forhead Box O
HE – Hematoxilina-Eosina
HFT – Hematoxilina Fosfotúngstica
IFA – Adjuvante incompleto de Freund
IκB – Inibidor de NF-κB
IKK – IκB quinase
IL – Interleucina
IM – Imobilizado
LC3 – Microtubule-associated protein 1 light chain 3
MAFbx – Muscle Atrophy F-box, também chamada de atrogina-1
MuRF – Muscle Ring Finger-1
NF-κB – Fator de Transcrição Nuclear κB
PAS – Periodic Acid Shift
TNF – Fator de Necrose Tumoral

4 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) foi descoberta no século XVII e descrita por Garrod em 1859. Finalmente em 1957 foi proposta, por Charles Short, como uma entidade clínica (1). Sua complexidade foi reconhecida, entretanto, após anos de pesquisa e sua etiologia permanece desconhecida.

A AR é uma doença sistêmica inflamatória autoimune com prevalência de aproximadamente 1% na população mundial (2). Ela é caracterizada por uma sinovite crônica, simétrica e erosiva, afetando primeiramente as articulações periféricas, resultando em deformidades e incapacitação. Estimativas recentes sugerem um custo anual de \$16 bilhões nos EUA, contudo no Brasil tal estimativa ainda não foram calculadas (3).

Alguns sinais e sintomas são característicos a esta população, como fadiga, fraqueza muscular e perda de peso. Isso poderia ser explicado pelos altos níveis circulantes de citocinas e proteínas de fase aguda, somados à dor articular e diminuição do exercício físico, que podem causar um estado de caquexia nesses pacientes (2). Caquexia reumatoide é uma forma anormal de composição corporal caracterizada por perda de massa muscular com massa gorda igual ou aumentada (4). Esse estado caquético reduz a capacidade funcional e a qualidade de vida dos portadores de doença, além disso, eleva o impacto econômico e contribui para o aumento da morbidade e mortalidade (4), afetando de 10 (5) a 67% (6) dos pacientes (4).

Embora a caquexia reumatoide seja altamente impactante sobre diversos aspectos, os mecanismos intracelulares envolvidos no seu desenvolvimento ainda não foram completamente elucidados, mas provavelmente estão relacionados com o hipermetabolismo causado por citocinas proinflamatórias (7).

Tendo em vista a escassez de informações sobre o tema, torna-se necessário estudar as características e sinalizações envolvidas na caquexia reumatoide. Para isso o uso de modelos experimentais de artrite crônica apresenta-se como uma excelente ferramenta. Isso nos fornecerá um melhor entendimento da patologia e dos mecanismos intracelulares envolvidos na atrofia muscular associada à artrite, podendo promover o desenvolvimento futuro de terapias que visem a minimizar ou prevenir esse problema.

Sendo assim, essa dissertação está composta por dois artigos, o primeiro é um artigo de revisão intitulado “MECANISMOS DE PERDA MUSCULAR NA SARCOPENIA”, aceito para publicação na **Revista Brasileira de Reumatologia** (Qualis Ciências Biológicas I e Medicina I, II e III: B4) que será utilizado como revisão bibliográfica desse trabalho. O segundo manuscrito trata-se de um artigo original derivado da pesquisa desenvolvida durante os dois anos de mestrado intitulado “*MUSCLE WASTING IN COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS IS DIFFERENT FROM DISUSE ATROPHY*”, submetido no periódico **Arthritis and Rheumatism**, (Qualis Ciências Biológicas II e III, Medicina I, II e III: A1).

Esse trabalho contou com o apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínica de Porto Alegre (FIPE), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA pelo número 09-235.

5 ARTIGO 1: MECANISMOS DE PERDA MUSCULAR DA SARCOPENIA

MECHANISMS OF MUSCLE WASTING IN SARCOPENIA

Autores:

Vivian de Oliveira Nunes Teixeira¹

Doutora Lidiane Isabel Filippin²

Professor Doutor Ricardo Machado Xavier³

Filiação:

¹ Aluna Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.

² Doutora em Medicina: Ciências Médicas (UFRGS), Professora do Centro Universitário Franciscano – Santa Maria/RS.

³ Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) Faculdade de Medicina, UFRGS/RS.

Endereço para correspondência:

Dr Ricardo Machado Xavier

Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-903

Bairro Rio Branco - Porto Alegre – RS

Fone: +55 51 3359 8340

E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

Apoio Financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): Edital Universal CNPq e Bolsa CNPq/PDJ, e Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE).

Não há conflito de interesse.

RESUMO

Em aproximadamente 66% dos pacientes com artrite reumatoide (AR) ocorre uma grande perda de massa celular chamada caquexia reumatoide, predominantemente de músculo esquelético (sarcopenia reumatoide). Sarcopenia é caracterizada por uma perda de massa muscular associada a prejuízos de função. Pacientes com AR possuem uma redução significativa na força muscular, causado pela perda de proteínas musculares alterando sua funcionalidade. As diversas condições que levam à perda de massa muscular envolvem distintas cascatas de sinalização intracelular que podem levar: (i) à morte celular programada (apoptose); (ii) ao aumento da degradação protéica, através da autofagia, de proteases dependentes de cálcio (calpaínas e caspases) e do sistema proteossomo; (iii) à diminuição da ativação das células satélites responsáveis pela regeneração muscular. Esse artigo tem como objetivo revisar esses mecanismos gerais de sarcopenia e seu envolvimento na artrite reumatoide. O melhor conhecimento desses mecanismos pode levar ao desenvolvimento de terapias inovadoras para essa debilitante complicação.

Palavras-chave: artrite, sarcopenia, inflamação, proteólise, regeneração.

ABSTRACT

Approximately 66% of rheumatoid arthritis (RA) patients present great loss of cell mass (rheumatoid cachexia), mainly of skeletal muscle (rheumatoid sarcopenia). Sarcopenia is defined by muscle mass wasting associated to impairment of function. RA patients possess significant reduction in muscle strength, caused by muscle protein wasting and loss of functionality. Various conditions leading to muscle loss involve different pathways of intracellular signaling that trigger: (i) programmed cell death (apoptosis); (ii) enhanced proteic degradation through autophagy, proteases dependent of calcium (calpain and caspase); (iii) decrease of satellite cell activation, responsible for muscle regeneration. The objective of this article is to review these general mechanisms of sarcopenia and their involvement in rheumatoid arthritis. Greater knowledge of these mechanisms may lead to the development of innovative therapies to this important comorbidity.

Key-words: arthritis, sarcopenia, inflammation, proteolysis, regeneration.

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória de etiologia desconhecida com manifestações autoimunes e caracterizada por sinovite crônica, simétrica e erosiva, preferencialmente de articulações periféricas ⁽¹⁾. A maioria dos pacientes apresenta o autoanticorpo fator reumatoide reagente. A AR tem uma prevalência de aproximadamente 0.46% na população brasileira ⁽²⁾ e 1% na população mundial ⁽³⁾, acometendo preferencialmente mulheres na faixa etária entre 30 e 60 anos.

Além das manifestações articulares, a AR apresenta diversas manifestações de cunho sistêmico que impactam significativamente na sua morbi-mortalidade. A **caquexia reumatoide** ⁽⁴⁾ ocorre em aproximadamente 66% dos pacientes com AR e é caracterizada pela perda de massa celular, predominantemente de músculo esquelético (sarcopenia reumatoide), e com manutenção ou leve elevação da massa gorda (total de tecido adiposo), resultando em limitada ou nenhuma perda de peso (massa total). A etiologia da caquexia reumatoide é multifatorial, incluindo a produção acentuada de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α e IL-1 β , alterações hormonais e inatividade física. Não há até o momento proposta terapêutica bem padronizada visando especificamente esse aspecto da AR, e os efeitos dos tratamentos atuais ainda não foram bem estudados.

Esse artigo tem como objetivo revisar os mecanismos moleculares envolvidos na sarcopenia e seu envolvimento na sarcopenia reumatoide. Para uma revisão dos aspectos clínicos da sarcopenia reumatoide sugere-se a leitura do artigo de Rocha e cols ⁽⁴⁾.

SARCOPENIA

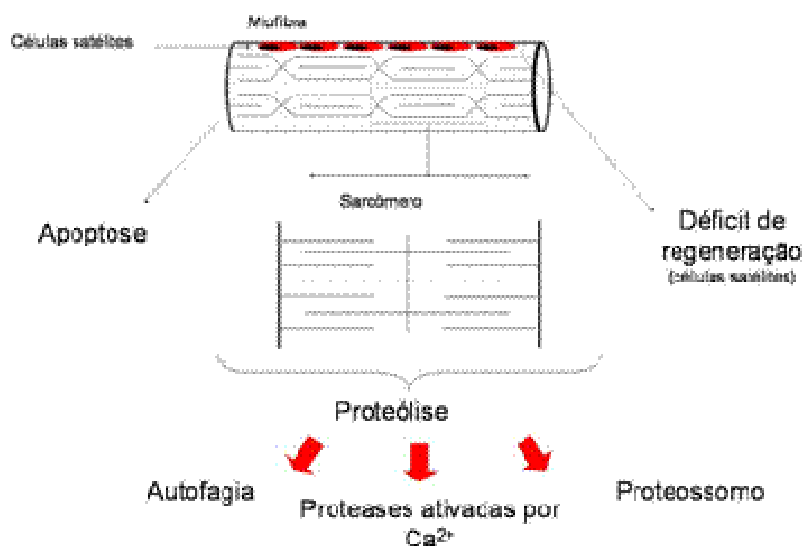
Sarcopenia é a perda de massa muscular associada a prejuízos de função. É decorrente de diversos fatores, como distúrbios da inervação, diminuição da atividade física, envelhecimento, anormalidades metabólicas, especialmente em proteínas, carboidratos e lipídeos, além de alterações na ativação das células satélites ^(4, 5). Na AR acredita-se que a ação de citocinas pró-inflamatórias, redução na síntese protéica em miócitos, limitação na atividade física, resistência insulínica e ingestão protéica inadequada também têm papel no seu desenvolvimento ^(6, 7).

O diagnóstico de sarcopenia pode ser realizado por diversos métodos, como ressonância nuclear magnética, tomografia computadorizada, bioimpedância, ultrassonografia, densitometria óssea corporal total e medidas antropométricas. Um método muito utilizado é a densitometria, que permite a avaliação da composição corporal, massa óssea, massa magra e massa adiposa total ⁽⁸⁾. As medidas antropométricas, proposta por Ashwell, também tem sido utilizada para avaliar a sarcopenia empregando a relação cintura-quadril ⁽⁹⁾.

MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA SARCOPENIA

As diversas condições que levam à perda de massa muscular envolvem distintas cascatas de sinalização intracelular que podem levar à morte celular programada (apoptose), ao aumento da degradação protéica ou ainda à diminuição da ativação das células satélites responsáveis pela regeneração muscular (Figura 1). A maior parte do nosso conhecimento sobre esses mecanismos é derivada de estudos em modelos experimentais de atrofia, como modelo de denervação, suspensão da pata, desuso, jejum ⁽¹⁰⁾, diabetes e câncer ⁽¹¹⁾, bem como estudos em biópsias de músculo em pacientes voluntários ⁽¹²⁾.

Figura 1 – Mecanismos moleculares envolvidos na sarcopenia. A perda muscular pode ocorrer por distintos mecanismos, como um déficit de regeneração pela inatividade de células satélites, apoptose e vias de degradação protéica, como por exemplo, proteases ativadas por cálcio, proteossomo e autofagia.



A seguir, discutimos esses mecanismos e o conhecimento atual sobre o envolvimento na sarcopenia reumatoide.

PERDA DE MASSA CELULAR

Apoptose é um importante processo que ocorre em organismos multicelulares, tanto durante o desenvolvimento quanto para manutenção da homeostase do tecido ⁽¹³⁾. Entretanto, o papel da apoptose em tecidos pós-mitóticos como o músculo esquelético não é bem claro.

Estágios iniciais da apoptose envolvem sinais indutores de morte celular, que causam um desequilíbrio na regulação de cálcio livre e alteração na composição de algumas famílias de proteínas ⁽¹⁴⁾. Após esse estágio, receptores de superfície celular ou vias mitocondriais são ativados desencadeando eventos citoplasmáticos e nucleares que levam à morte celular ⁽¹⁵⁾. As caspases são as principais enzimas envolvidas no início e execução da apoptose, sendo responsáveis pela clivagem proteolítica de um amplo espectro de alvos celulares ⁽¹⁶⁾, embora não sejam exclusivamente iniciadoras deste processo ⁽¹⁷⁾.

Em relação à potencial participação da apoptose na sarcopenia, observou-se que mesmo em modelo de marcada atrofia, como o modelo de denervação muscular em camundongos, evidências de apoptose significativa só foram observadas após 2 meses, indicando um papel limitado desse mecanismo nos estágios iniciais da atrofia. ⁽¹⁸⁾

PROTEÓLISE MUSCULAR

A sarcopenia é o resultado do desequilíbrio entre degradação e síntese de proteínas, embora aparentemente a exata contribuição de cada um desses fatores seja variável conforme o modelo estudado.

Alguns sistemas proteolíticos têm sido descritos como participantes na degradação muscular. Entre esses podem ser citados o processo de autofagia, proteases ativadas por cálcio, como a calpaína e as caspases, e o sistema ubiquitina-proteossomo (Figura 1) ^(19, 20).

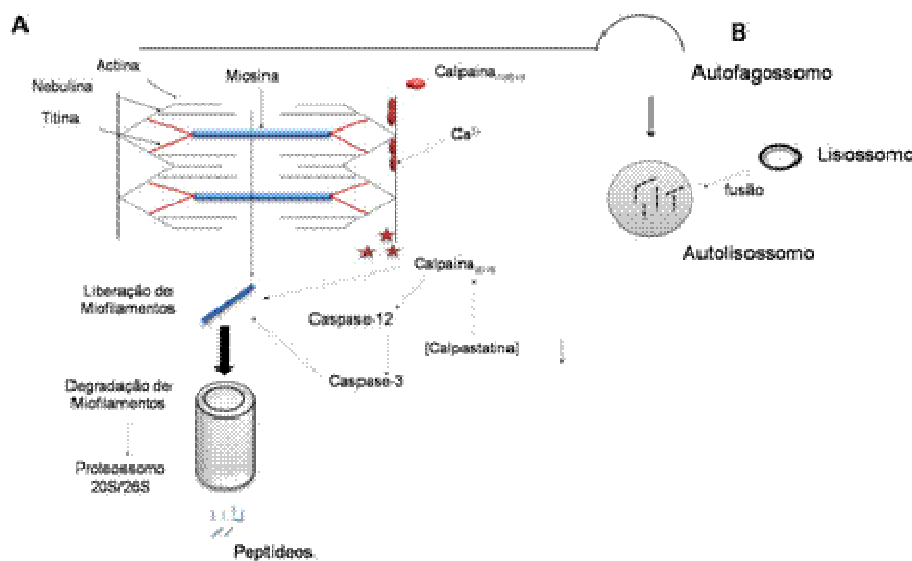


Figura 2 – Vias de proteólise muscular. Em “A” ativação de proteases ativadas por cálcio. As calpaínas clivam as proteínas que ancoram o complexo actina-miosina liberando essas proteínas para ser degradado por outro sistema de proteólise celular (proteossomo). Em “B” é demonstrado o sistema da autofagia, em que os constituintes citoplasmáticos são isolados e degradados no autolisossomo.

Em modelos experimentais *in vivo* e em humanos não existe consenso sobre a importância relativa das diferentes vias de degradação proteica. Purintrapiba et al⁽²⁰⁾ estudaram o papel desses diferentes mecanismos de proteólise em cultura de células musculares. A inibição dos sistemas enzimáticos calpaína, proteossomo e lisossomo ocasionou 20, 62, e 40% de redução na degradação de proteínas totais, respectivamente. Entretanto parece claro que há significativa variação na participação de cada uma dessas vias dependendo da situação clínica envolvida (p.ex: denervação, imobilização, caquexia da malignidade, inflamação crônica)⁽¹⁹⁻²¹⁾.

Autofagia

Autofagia é um mecanismo ancestral de sobrevivência celular que permite às células se autoconsumirem durante períodos de extrema privação nutricional⁽²²⁾. Esse processo ocorre com o consumo de componentes citoplasmáticos, como o citosol e organelas celulares, e é dependente de lisossomo. Durante a autofagia, vesículas de

membrana dupla, os autofagossomos, se formam em torno de grande parte de citoplasma ou de organelas inteiras, sequestrando os substratos protéicos no sistema vacuolar. Após, ocorre a fusão do autofagossomo com o lisossomo, formando o autolisossomo, e subsequente hidrólise dos substratos pelas hidrolases lisossomais ⁽²³⁾ (Figura 2). Essas estão fisicamente isoladas dos constituintes citoplasmáticos pela membrana lisossomal e, por isso, possuem maior capacidade de degradar os componentes citoplasmáticos do que os componentes miofibrilares ⁽²⁴⁾.

Evidências de estudos *in vitro* ⁽²⁵⁾ e *in vivo* ⁽²⁶⁾ demonstram a presença de autofagossomos em fibras musculares de cultura de miotubos e em camundongos. No estudo *in vitro*, em cultura de miócitos com restrição de aminoácidos, foi demonstrada que a aceleração do catabolismo protéico deve-se principalmente à indução de autofagia ⁽²⁵⁾. Mizushima et al (2004), em estudo *in vivo* ⁽²⁶⁾, demonstrou, através da observação de superexpressão de LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), a ativação do sistema de autofagia no músculo esquelético de camundongos expostos ao jejum. A LC3 é essencial para manter a integridade da membrana e crescimento celular e está superexpressa, junto a outros genes envolvidos na autofagia e perda muscular, em diferentes modelos de atrofia ^(27, 28) e é indicadora de atividade autofágica ⁽²⁹⁾.

Apesar dos distintos mecanismos de sarcopenia, as vias que ativam os sistemas de autofagia e ubiquitina-proteossomo (discutida a seguir) são comuns. Ambas vias envolvem o fator de transcrição FoxO3 (forhead box O) e o fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-κB). A FoxO3 é translocada para o núcleo na ausência de estímulos de síntese protéica ⁽³⁰⁾, enquanto o NF-κB é translocado quando há inflamação (discutido abaixo) ⁽³¹⁾. A FOXO3 foi identificada como fator crítico para o controle da autofagia muscular ⁽³²⁾, e vários genes de autofagia estão sobre a regulação desse fator de transcrição ⁽³⁰⁾.

Proteases ativadas por Cálcio: Calpaína e Caspases

O sistema calpaína constitui uma via de degradação de proteínas de células eucarióticas composto de duas enzimas (calpaínas) e a calpastatina. Essas proteases são cisteíno-proteases não-lisossomais dependentes de cálcio livre citoplasmático ⁽³³⁾ e possuem um inibidor endógeno, a calpastatina, que regula sua atividade ⁽²¹⁾ (Figura 2).

As calpaínas não são capazes de degradar proteínas em aminoácidos ou pequenos peptídeos e não catalizam a degradação do complexo de proteínas sarcoplasmáticas. Apesar de não degradarem diretamente as proteínas contráteis do músculo, as calpaínas clivam as proteínas que ancoram o complexo actina-miosina, liberando os componentes protéicos do sarcômero para serem degradados por outro sistema de proteólise celular ^(20, 34). Dentre os substratos da calpaína, podemos citar a titina, a nebulina, a desmina e a filamina, proteínas que ancoram o sarcômero ^(33, 35) e também a troponina e a tropomiosina do sarcômero ^(33, 36), o que propiciaria a liberação do complexo actina-miosina.

A ativação do sistema calpaína já foi demonstrada em diversas situações de atrofia muscular, tais como no músculo durante períodos prolongados de inatividade ⁽³³⁾, envelhecimento, distrofias, e outras patologias que acompanham a perda de massa muscular ⁽²⁴⁾.

Caspases são cisteíno proteases citoplasmáticas não dependentes de cálcio capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspartático, uma especificidade incomum entre proteases ⁽²⁴⁾.

A caspase-3 parece ter a capacidade de degradar o complexo actina-miosina. Du et al (2004) ⁽³⁷⁾ demonstrou que a caspase-3 purificada e ativada consegue clivar a actina, desfazendo o complexo actina-miosina do músculo e liberando essas proteínas para serem degradadas por outros complexos proteolíticos. ⁽¹⁶⁾ (figura 2). Apesar de ativadas na perda muscular, o real papel desempenhado pelas caspases ainda é controverso.

Proteossomo

Outro sistema proteolítico relacionado a sarcopenia e atualmente considerado um dos sistemas mais importantes é o sistema ubiquitina-proteossomo. Esse sistema altamente conservado é a principal maquinaria de degradação protéica não lisossomal em células eucarióticas ⁽³⁸⁾ (Figura 2).

O sistema ubiquitina-proteossomo é responsável por processar e degradar proteínas celulares essenciais para a regulação do desenvolvimento, diferenciação, proliferação, apoptose, transdução de sinal, resposta imune e inflamatória, entre outros, governando assim processos celulares básicos ^(39, 40).

Proteínas celulares destinadas à degradação pelo proteossomo devem estar devidamente marcadas com uma ligação covalente de múltiplos monômeros de ubiquitina, peptídeos compostos de 76 aminoácidos. A ubiquitina pode ser conjugada a substratos protéicos específicos, processo que requer três componentes enzimáticos (Figura 3): E1, uma enzima ativadora de ubiquitina; E2, uma enzima conjugadora de ubiquitina; e E3, uma enzima ligante de ubiquitina. Inicialmente, E1 é ativada e, em uma reação dependente de energia, transfere, através da E2, a ubiquitina para a E3, que catalisa a ligação da ubiquitina à proteína, marcando-a para ser degradada ⁽⁴¹⁾. Esse processo de degradação de proteína poli-ubiquitinadas ocorre no proteossomo (20S ou 26S), que é um complexo composto de uma ou três grandes enzimas com a função de degradar proteínas desnecessárias ou danificadas da célula ⁽¹⁹⁾.

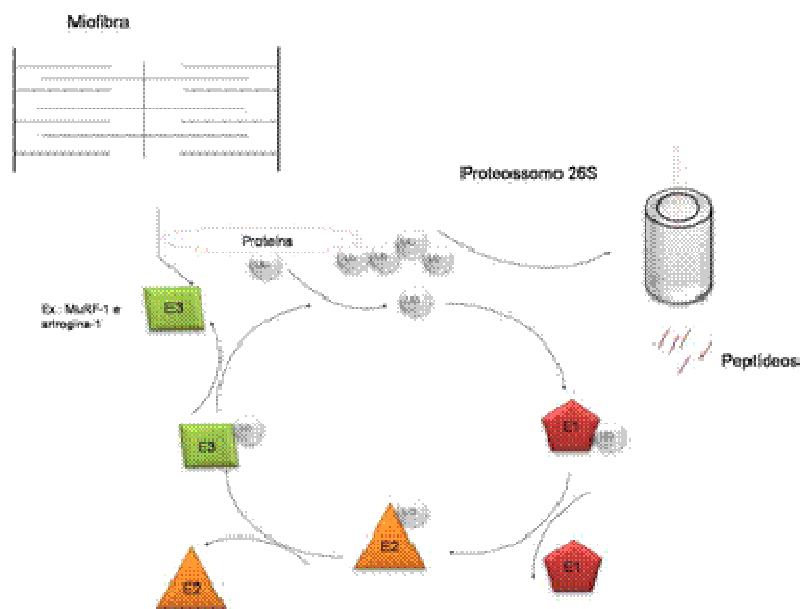


Figura 3 – Sistema proteossomo de degradação muscular. O sistema ubiquitina-proteossomo é um complexo multiproteico citoplasmático que degrada proteínas marcadas por ubiquitina. Essa degradação requer a participação de três proteínas distintas (E1, E2 e E3). As proteínas E3 conferem especificidade às proteínas que serão degradadas. Na atrofia muscular foram descritas algumas enzimas E3, como MuRF-1 e atrogina-1.

As enzimas do tipo E3 conferem especificidade à proteína alvo para degradação. Centenas de E3 diferentes já foram identificadas, e parece que cada uma modula a ubiquitinização de um grupo de substratos proteicos ⁽⁴¹⁾. No músculo esquelético foram identificadas duas E3 específicas que estão relacionadas ao

processo de atrofia, a atrogina-1 (Muscle Atrophy F-box) ou MAFbx e a MuRF-1 (Muscle Ring Finger-1) ⁽⁴²⁾. Foi descrita uma terceira ubiquitina ligase E3, a NEDD-4, que parece facilitar a atrofia muscular em modelos de denervação e suspensão da pata traseira ⁽⁴³⁾.

A MuRF-1 é uma enzima ubiquitina ligase E3 reconhecida como um marcador do processo de atrofia muscular em diversos modelos experimentais ⁽⁴⁴⁾. Essa proteína tem a capacidade de ligar-se à titina da linha M ⁽⁴⁵⁾, a terceira em abundância dentre as proteínas musculares (10%) ⁽⁴⁶⁾.

Alguns estudos descreveram o aumento da expressão de subunidades do proteossomo e de enzimas ubiquitinantes durante a atrofia muscular ⁽⁴⁷⁾, bem como aumento da expressão de E3 ligases em modelos de denervação, imobilização, restrição alimentar, diabetes e uremia ⁽⁴⁸⁾. Esses estudos sugerem que a perda muscular está relacionada com a atividade das E3 ligases MuRF-1 e atrogina-1 ⁽⁴⁸⁾. Em modelos murinos, a inibição do proteossomo pode reduzir a degradação protéica durante a atrofia ⁽⁴⁹⁾, indicando um importante papel da via ubiquitina-proteossomo na sarcopenia, mas não é possível extrapolar esses resultados para humanos ⁽⁵⁰⁾. Inibidores biológicos e sintéticos do proteossomo podem inibir o ciclo celular e induzir apoptose preferencialmente em células neoplásicas ⁽⁵¹⁾.

O papel dessa via na perda muscular de humanos foi revisado por Murton et al ⁽¹²⁾, sugerido que a ativação das ubiquitinas-ligases MAFbx/atrogina-1 e MuRF-1 ocorre principalmente durante processo inflamatórios.

A atrofia muscular que ocorre através da superexpressão do sistema ubiquitina-proteossomo parece envolver vias distintas. Estudos têm demonstrado essa sinalização via o fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-κB), que induz a expressão de genes relacionados ao processo de sarcopenia, tais como MuRF-1 e MAF-bx, além de citocinas pró-inflamatórias. A ativação do NFκB está envolvida na atrofia muscular causada pelo desuso e por caquexia, embora os mecanismos não estejam completamente esclarecidos ⁽⁵²⁾. Existem evidências do envolvimento do estresse oxidativo nessa ativação ⁽⁵³⁾. Além da via do NF-κB, o aumento da expressão de MuRF-1 e MAF-bx ⁽³¹⁾ também pode ocorrer via FOXO3 ⁽³⁰⁾ e miogenina (ver abaixo) ⁽⁵⁴⁾.

CÉLULAS SATÉLITES

Além da degradação protéica, déficits no processo de regeneração muscular também podem estar envolvidos na sarcopenia (Figura 1).

Células satélites (CS) são precursores miogênicos quiescentes encontradas no músculo adulto entre a lâmina basal e o sarcolema e apresentam algumas propriedades de células tronco⁽⁵⁵⁾. CS podem ser ativadas em resposta a estímulos de crescimento, remodelamento ou lesão muscular^(56, 57). Na ativação, elas entram no ciclo celular, se dividem, se diferenciam em mioblastos e se fundem para formar miotubos, que então se desenvolvem em uma nova fibra ou se fusionam com fibras musculares já existentes para reparar miofibras danificadas e/ou para aumentar a hipertrofia das fibras musculares⁽⁵⁸⁾.

Quando as CS são ativadas podem ser identificadas pela expressão de marcadores, tais como MyoD e miogenina, indicadores de proliferação e diferenciação de células satélites, respectivamente⁽⁵⁹⁾.

Alguns estudos demonstraram que co-cultura de precursores musculares com macrófagos aumenta a proliferação e diferenciação de mioblastos, sugerindo o envolvimento de mediadores inflamatórios na ativação de células satélites⁽⁶⁰⁾. Entre os mediadores inflamatórios, o TNF- α está aumentado no tecido muscular pós-lesão, mas também parece estar envolvido na regeneração muscular^(61, 62).

Nosso grupo, estudando processos inflamatórios agudos em modelo experimental de contusão muscular, demonstrou o importante envolvimento da produção local de óxido nítrico na proliferação e diferenciação das células satélites^(57, 63).

Entretanto, pouco se conhece da via pela qual a sarcopenia é ativada e qual é o estímulo inicial que desencadeia a ativação das CS na vigência de processo inflamatório crônico. Existe uma aparente contradição entre o aumento de ativação dessas células regenerativas e o resultado final, que é atrofia muscular. Há necessidade de mais estudos para esclarecer se essa ativação de CS, que ocorre provavelmente como uma tentativa de regenerar o músculo atrofado, é insuficiente para compensar a perda proteica ou se o processo de miogênese não se completa, devido, por exemplo, a apoptose.

SARCOPENIA NA ARTRITE REUMATOIDE

Apesar do progresso no conhecimento dos mecanismos moleculares que levam à atrofia muscular em diversas situações, a sarcopenia reumatoide ainda é muito pouco estudada. Funcionalmente os pacientes com AR apresentam redução significativa na força muscular, mas a velocidade e propriedades contráteis musculares se mantêm inalteradas ⁽⁶⁾. Esses dados demonstram que o impacto da doença ocorre através de perda protéica afetando principalmente sarcômeros em paralelo, preservando o número de sarcômeros em série.

Existe uma escassez de informação das vias de perda muscular na AR, especialmente pelo mecanismo de apoptose. Até o momento não existem estudos realizados em indivíduos com AR ou em modelos animais de artrite crônica demonstrando o real papel da apoptose na perda muscular. Em estudos em nosso laboratório, não observamos corpos apoptóticos ou marcação com caspase-3 em músculo gastrocnêmio de camundongos com artrite induzida por colágeno (CIA) (dados não publicados), sugerindo que esse mecanismo não tenha um papel marcante na sarcopenia reumatoide.

Da mesma forma não existem estudos em modelos experimentais ou em pacientes com artrite reumatoide avaliando a participação de mecanismos de autofagia, ativação de calpains e caspases.

Quanto à via do proteossomo, o aumento das enzimas ligantes de ubiquitina E3 associadas à proteólise muscular já foi identificado no músculo esquelético de modelos murinos de artrite ^(64, 65), mas os outros componentes da via ubiquitina-proteossomo ainda não foram estudados, como a ubiquitina e subunidades proteossomais, bem como em que estágio da doença ocorre o desenvolvimento da atrofia. Pela via ubiquitina-proteossomo, foi observado o aumento da expressão de MuRF-1 e MAF-bx ⁽³¹⁾ pela NF- κ B, FOXO3 ⁽³⁰⁾ e miogenina ⁽⁵⁴⁾, dados não confirmados em músculo de humanos com artrite. Dessa forma, embora seja a via proteolítica mais estudada em geral, sua importância ainda não foi confirmada em pacientes com artropatia crônica.

Finalmente, Castellero et al (2009) ⁽⁶⁵⁾ demonstraram que na atrofia no músculo gastrocnêmio em modelo de artrite induzida por adjuvante de Freund (CFA) havia ativação e proliferação de células satélites através de seus marcadores miogenina e

MyoD. Esses achados necessitam de confirmação em outros modelos experimentais, bem como em estudos com pacientes.

CONCLUSÃO

Discutimos como diversas vias intracelulares estão envolvidas, de maneira inter-relacionada, com o processo de perda de massa muscular. Essas vias, divididas em mecanismos de apoptose celular, proteólise das miofibrilas e alteração na regeneração celular através das células satélites, vêm sendo ativamente estudadas em diversas condições experimentais e clínicas. Observa-se que esses mecanismos não estão presentes de maneira uniforme nessas condições, havendo variação significativa na importância relativa de cada conforme a situação clínica. Portanto, é provável que o melhor manejo preventivo e terapêutico também não seja o mesmo para todas as situações de atrofia muscular.

Apesar de significativa perda de massa muscular que ocorre na maioria dos pacientes com artrite reumatoide, com um profundo impacto socioeconômico e funcional nesta população, não há até o momento proposta terapêutica padronizada para essa complicação. Há muito poucos estudos avaliando o impacto das terapias atuais na perda de massa muscular ⁽¹⁶⁾. Da mesma forma, conforme discutimos acima, praticamente não existem estudos sobre a participação das diversas cascatas que levam a atrofia e a regeneração muscular em modelos experimentais ou em pacientes com artropatias crônicas. Mais estudos nessa área serão de grande relevância, pois uma maior compreensão dos mecanismos de modulação entre catabolismo e anabolismo muscular deverá resultar em desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras mais eficazes e melhor qualidade de vida a esses pacientes.

ADENDO

Após o aceite desse artigo, foi publicado recentemente um artigo estudando inflamação articular, seus efeitos na perda muscular e comparando esses dados com um modelo de imobilização.

Utilizando-se de um modelo de inflamação aguda articular, Ramirez et al descreveu (8) atrofia de músculo adjacente no sétimo dia de inflamação, detectada

através de uma redução da área seccional da miofibra de 20%. Nesse mesmo tempo, foi observado a ativação de rotas intracelulares como proteína quinase ativada por mitose p38 (p38MAPK), fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) e uma expressão aumentada de atrogina-1, MuRF-1, fator de diferenciação miogênica-1 (MyoD), miostatina e fator de necrose tumoral-α (TNF-α). No modelo de desuso, detectaram atrofia muscular nesses animais a partir do 2º dia de imobilização, junto com um aumento da expressão de atrogina-1, MuRF-1, NF-κB, e TNF-α em todos os tempos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kinne RW, Brauer R, Stuhlmuller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2(3):189-202.
2. Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol.* 2004 Mar;31(3):594-7.
3. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2001 Sep 15;358(9285):903-11.
4. Rocha OM, Batista AAP, Maestá N, Burini RC, Laurindo IMM. Sarcopenia da caquexia reumatoide: conceituação, mecanismos, consequências clínicas e tratamentos possíveis. *Revista Brasileira de Reumatologia.* 2009;49(3):288-301.
5. Doherty TJ. Invited review: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol.* 2003 Oct;95(4):1717-27.
6. Matschke V, Murphy P, Lemmey AB, Maddison P, Thom JM. Skeletal Muscle Properties in Rheumatoid Arthritis Patients. *Medicine & Science in Sports & Exercise.* 2010;42(12):2149-55 10.1249/MSS.0b013e3181e304c3.
7. Rall LC, Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology.* 2004;43(10):1219-23.
8. Silva TAA, Frisoli Junior A, Pinheiro MM, Szejnfeld VL. Sarcopenia associada ao envelhecimento: aspectos etiológicos e opções terapêuticas. *Rev Bras Reumatol.* [Review]. 2006 2010-11-08;46(6):391-7.
9. Ashwell M, Chinn S, Stalley S, Garrow JS. Female fat distribution - A simple classification based on 2 circumference measurements. *International Journal of Obesity.* 1982;6(2):143-52.
10. Calura E, Cagnin S, Raffaello A, Laveder P, Lanfranchi G, Romualdi C. Meta-analysis of expression signatures of muscle atrophy: gene interaction networks in early and late stages. *Bmc Genomics.* 2008;9.
11. DeBoer MD. Animal models of anorexia and cachexia. *Expert Opinion on Drug Discovery.* [Review]. 2009 Nov;4(11):1145-55.
12. Murton AJ, Constantin D, Greenhaff PL. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease.* 2008;1782(12):730-43.
13. Dupont-Versteegden EE. Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy. *World Journal of Gastroenterology.* 2006;12(46):7463-6.
14. Primeau AJ, Adihetty PJ, Hood DA. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Canadian Journal of Applied Physiology-Revue Canadienne De Physiologie Appliquee.* 2002;27(4):349-95.
15. Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death and Differentiation.* 2004;11(6):591-5.
16. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry.* 1999;68:383-424.
17. Garrido C, Kroemer G. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Current Opinion in Cell Biology.* 2004;16(6):639-46.
18. Bruusgaard JC, Gundersen K. In vivo time-lapse microscopy reveals no loss of murine myonuclei during weeks of muscle atrophy. *Journal of Clinical Investigation.* 2008;118(4):1450-7.
19. Hasselgren PO, Wray C, Mammen J. Molecular regulation of muscle cachexia: It may be more than the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2002;290(1):1-10.
20. Purintrapiban J, Wang MC, Forsberg NE. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology.* 2003;136(3):393-401.
21. Powers SK, Kavazis AN, DeRuisseau KC. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology.* 2005;288(2):R337-R44.
22. Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: Cell survival in the land of plenty. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2005;6(6):439-48.
23. Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Cornbaret L, Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2005;37(10):2098-114.

24. Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: The proteasome and the calpains. *J Anim Sci.* 2008 April 1, 2008;86(14_suppl):E19-35.
25. Mordier S, Deval C, Bechet D, Tassa A, Ferrara M. Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry.* 2000;275(38):29900-6.
26. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell.* 2004;15(3):1101-11.
27. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb Journal.* 2004;18(1):39-51.
28. Sackey JM, Hyatt JPK, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, et al. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *Faseb Journal.* 2007;21(1):140-55.
29. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2009;10(7):458-67.
30. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metabolism.* 2007;6(6):458-71.
31. Li H, Malhotra S, Kumar A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *Journal of Molecular Medicine-Jmm.* 2008;86(10):1113-26.
32. Wohlgemuth SE, Seo AY, Marzetti E, Lees HA, Leeuwenburgh C. Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: Effects of calorie restriction and life-long exercise. *Experimental Gerontology.* 2010;45(2):138-48.
33. Goll DE, Thompson VF, Li HQ, Wei W, Cong JY. The calpain system. *Physiological Reviews.* 2003;83(3):731-801.
34. Koh TJ, Tidball JG. Nitric oxide inhibits calpain-mediated proteolysis of talin in skeletal muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2000;279(3):C806-C12.
35. Goll DE, Dayton WR, Singh I, Robson RM. Studies of the alpha-actinin actin interaction in the Z-disk by using calpain. *Journal of Biological Chemistry.* 1991;266(13):8501-10.
36. Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Zaleska T. Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin. *Bioessays.* 1992;14(8):549-56.
37. Du J, Wang XN, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *Journal of Clinical Investigation.* 2004;113(1):115-23.
38. Naujokat C, Fuchs D, Berges C. Adaptive modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research.* 2007;1773:1389-97.
39. Naujokat C, Hoffmann S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Laboratory Investigation.* 2002;82(8):965-80.
40. Wolf DH, Hilt W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research.* 2004;1695(1-3):19-31.
41. Li YP, Chen YL, Li AS, Reid MB. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2003;285(4):C806-C12.
42. Hasselgren PO, Wray C, Mammen J. Molecular regulation of muscle cachexia: it may be more than the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jan 11;290(1):1-10.
43. Koncarevic A, Jackman RW, Kandarian SC. The ubiquitin-protein ligase Nedd4 targets Notch1 in skeletal muscle and distinguishes the subset of atrophies caused by reduced muscle tension. *Faseb Journal.* 2007;21(2):427-37.
44. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001 Nov 23;294(5547):1704-8.
45. Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC, et al. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol.* 2001 Mar 2;306(4):717-26.
46. Wang K, McClure J, Tu A. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Aug;76(8):3698-702.
47. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of Nutrition.* 1999;129(1):227S-37S.

48. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VKM, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001;294(5547):1704-8.
49. Tawa NE, Jr., Odessey R, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest*. 1997 Jul 1;100(1):197-203.
50. Rennie MJ, Selby A, Atherton P, Smith K, Kumar V, Glover EL, et al. Facts, noise and wishful thinking: muscle protein turnover in aging and human disuse atrophy. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2010;20(1):5-9.
51. Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(3):630-9.
52. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2004;287(4):C834-C43.
53. Filippin LI, Vencelino R, Marroni NP, Xavier RM. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. *Rev Bras Reumatol*. 2008;48(1):17-24.
54. Moresi V, Williams AH, Meadows E, Flynn JM, Potthoff MJ, McAnally J, et al. Myogenin and Class II HDACs Control Neurogenic Muscle Atrophy by Inducing E3 Ubiquitin Ligases. *Cell*. 2010;143(1):35-45.
55. Cassano M, Quattrocchi M, Crippa S, Perini I, Ronzoni F, Sampaolesi M. Cellular mechanisms and local progenitor activation to regulate skeletal muscle mass. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2009;30(7-8):243-53.
56. Morgan JE, Partridge TA. Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003 Aug;35(8):1151-6.
57. Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. *Nitric Oxide*. 2011;24(1):43-9.
58. Yamada M, Sankoda Y, Tatsumi R, Mizunoya W, Ikeuchi Y, Sunagawa K, et al. Matrix metalloproteinase-2 mediates stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells in a nitric oxide-dependent manner. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(10):2183-91.
59. Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2005;16(4-5):585-95.
60. Massimino ML, Rapizzi E, Cantini M, DallaLibera L, Mazzoleni F, Arslan P, et al. ED2+ macrophages increase selectively myoblast proliferation in muscle cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;235(3):754-9.
61. Chen SE, Jin BW, Li YP. TNF-alpha regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2007;292(5):C1660-C71.
62. Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinstry M, Mishra M, Luster MI, et al. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *Faseb Journal*. 2002;16(10):1630-+.
63. Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*. 2009;21(3-4):157-63.
64. Granado M, Martin AI, Priego T, Lopez-Calderon A, Villanua MA. Tumour necrosis factor blockade did not prevent the increase of muscular muscle RING finger-1 and muscle atrophy F-box in arthritic rats. *Journal of Endocrinology*. 2006;191(1):319-26.
65. Castellero E, Martin AI, Lopez-Menduina M, Granado M, Villanua MA, Lopez-Calderon A. IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009;309(1-2):8-16.

6 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Descrever o envolvimento muscular e vias moleculares em um modelo experimental de artrite e em um modelo de atrofia por desuso.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar o desenvolvimento da artrite na articulação tíbio-tarsal através de escore histopatológico;
- Avaliar a locomoção espontânea dos animais e comparar com o grupo controle;
- Comparar peso o peso corporal e muscular nos diferentes grupos experimentais;
- Identificar histologicamente mudanças morfológicas do músculo gastrocnêmio relacionadas à atrofia e degeneração de fibras musculares;
- Avaliar a presença de infiltrado inflamatório no músculo gastrocnêmio dos diferentes grupos experimentais;
- Diferenciar os tipos de fibras do músculo gastrocnêmio e identificar suas proporções;
- Medir o diâmetro das fibras musculares nos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar a expressão das proteínas miogenina, MURF-1 e LC3 por imunoblot, nos diferentes grupos experimentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO E DO ADENDO

1. Short CL, Bauer W, Reynolds WE. Rheumatoid arthritis. Harvard, London: University Press, Oxford University Press.; 1957.
2. Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol.* 2004;31(3):594-7.
3. Dunlop DD, Manheim LM, Yelin EH, Song J, Chang RW. The costs of arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;49(1):101-13. Epub 2003/02/13.
4. Summers GD, Deighton CM, Rennie MJ, Booth AH. Rheumatoid cachexia: a clinical perspective. *Rheumatology.* 2008;47(8):1124-31.
5. Morley JE, Thomas DR, Wilson MMG. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2006;83(4):735-43.
6. Roubenoff R, Roubenoff RA, Ward LM, Holland SM, Hellmann DB. Rheumatoid cachexia - Depletion of lean body mass in rheumatoid-arthritis - Possible association with tumor necrosis-factor. *Journal of Rheumatology.* 1992;19(10):1505-10.
7. Tracey KJ, Morgello S, Koplin B, Fahey TJ, Fox J, Aledo A, et al. Metabolic effects of cachectin tumor-necrosis-factor are modified by site of production - Cachectin tumor necrosis factor-secreting tumor in skeletal-muscle induces chronic cachexia, while implantation in brain induces predominately acute anorexia. *Journal of Clinical Investigation.* 1990;86(6):2014-24.
8. Ramirez C, Russo TL, Cristina Sandoval M, Dentillo AA, Silva Couto MA, Quagliotti Durigan JL, et al. Joint Inflammation Alters Gene and Protein Expression and Leads to Atrophy in the Tibialis Anterior Muscle in Rats. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation.* 2011;90(11):930-9.

7 ARTIGO 2: MUSCLE WASTING IN COLLAGEN INDUCED ARTHRITIS IS DIFFERENT FROM DISUSE ATROPHY

MUSCLE WASTING IN COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS IS DIFFERENT FROM DISUSE ATROPHY

Vivian de Oliveira Nunes Teixeira ^{1,3}, PhD Lidiane Isabel Filippin ^{2,3}, Paula Ramos Viacava ³, PhD Patrícia Gnieslaw de Oliveira ^{1,3}, MD, PhD Ricardo Machado Xavier ^{1,3}

1 Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos 2400, CEP 90035-003, Porto Alegre, Brasil

2 Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), Rua Silva Jardim 1175, CEP: 97010.491, Santa Maria, Brasil

3 Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, Brasil

Corresponding author: Dr Ricardo Machado Xavier

Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-903

Bairro Rio Branco - Porto Alegre – RS

Fone: +55 51 3359 8340

E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

Grants: This study had the financial support of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): Edital Universal CNPq (processo: 474659/2009-7); Bolsa CNPq/PDJ (processo: 500320/2010-1), Edital MCT/CNPq n.º 12/2010 - IC and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE).

There was no conflict of interests in the development in this work.

ABSTRACT

Objective: Although causing great functional impact, the mechanisms of muscle wasting in RA have been poorly studied. The objective of this study is to describe the muscular involvement in an experimental model of arthritis and its pathways and compare with disuse atrophy.

Methods: Female Wistar rats were separated in three groups: control (CO), collagen-induced arthritis (CIA) and immobilized (IM). Spontaneous locomotion and weight were evaluated weekly. Gastrocnemius muscle was evaluated by histology and immunoblotting to measure LC3, MuRF-1 and myogenin expression. Significance was considered at $p < 0.05$ level.

Results: Histological analysis of the joint confirmed the severity of the arthropathy. There was significant difference in spontaneous locomotion (distance, velocity, number of times standing and number of times resting) in CIA group. Animal body weight, gastrocnemius muscle weight and relative muscle weight decreased 20%, 30% and 20% in CIA rats. Inflammatory infiltration, swelling and type 2 fiber atrophy was present in CIA gastrocnemius muscles, with reduced cross-sectional area by 30%, and 60% in IM. Immunoblotting analysis demonstrated increased expression of myogenin and MuRF-1 in CIA muscles by about 70%, while in IM remained similar to control.

Conclusions: This study demonstrated that the development of experimental arthritis is associated to decreased mobility, weight loss, muscle atrophy, increased expression of markers of muscle proteolysis and regeneration. For the first time it is demonstrated that muscle atrophy in arthritis is associated with the disease itself, and not simply due to decreased mobility, since immobilized group presented no activation of the same atrophy pathways.

Key words: muscle atrophy, collagen-induced arthritis, impaired locomotion, immobilization, regeneration.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory systemic autoimmune disease with prevalence of approximately 1% in the world population (1). It is characterized by a chronic, symmetric and erosive synovitis, mainly of peripheral joints, resulting in joint deformities and incapacitation. Rheumatoid cachexia is a common and important complication of RA, affecting 10 to 67% of the patients. It is characterized by an abnormal body composition, with wasting of muscle mass and with preservation of, or increase in, fat mass (2).

The cachectic state may give rise to weight loss, decreased physical activity, increased fatigue and weakness, setting off a vicious cycle which leads to significant loss of functional capacity and quality of life, with an elevated socioeconomic impact (2). Cachexia is an important contributor in increasing morbidity and mortality in rheumatoid arthritis, being associated with an increased risk of cardiovascular disease (2).

The mechanisms of rheumatoid cachexia have yet to be fully elucidated, but probably include cytokine-driven hypermetabolism, particularly by TNF- α (3). Although experimental arthritis induces anorexia, muscle wasting is not due to the decrease in food intake (4). Muscle loss has been associated with the intensity of inflammation and the severity of the disease (5).

Muscle atrophy is a complex process that can involve different proteolytic systems. These can be lysosomal proteases present in autophagy, proteases activated by calcium, like calpain and caspase, and the ubiquitin-proteasome system (6). Enzymes from the proteasome system specific to the skeletal muscle, MuRF-1 (muscle-specific RING finger protein 1) and atrogin-1/MAFbx (muscle atrophy F-box), have been investigated for their role in muscle atrophy (7). Besides protein degradation, deficient muscle satellite cell activation and muscle regeneration may also

be involved in muscle atrophy (8). The participation of these mechanisms have not been well studied in RA or in experimental models.

This study was designed to explore the mechanisms involved in skeletal muscle atrophy in experimental arthritis and immobilization models, including histological analysis, presence of autophagy, proteasome proteolysis and satellite cell activation.

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental groups.

Female Wistar rats from 8 to 12 weeks of age were used. The animals were reared at 20°C, with 12 hours light-dark cycle and free access to food and water. All experiments were performed according to the Guiding Principles for Research Involving Animals (NAS), and to the Committee of Research and Ethics in Health of the Research and Postgraduate Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Experimental animals were first randomly divided into three groups: control (CO, n=7), immobilized (IM, n=5) and collagen-induced arthritis (CIA, n=7). In the IM group, paws were immobilized with a copper boot, made from a copper sheet covered with a layer of cotton, for ten days (Supplementary Figure 1). Arthritis was induced with bovine type II collagen (CII, Chondrex, Inc.) dissolved in 0.1 M acetic acid at 4°C for 12h with complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma, St Louis, MO, USA) containing inactivated *Mycobacterium tuberculosis*. CII (2 µg/ml) and CFA (1 µg/ml) were mixed with equal volumes to form the emulsion.

Experimental procedures.

During the procedure, rats were anesthetized with isoflurane (1 ml/ml, Abbott). At day zero, 0.1 ml of emulsion was injected intradermally at the base of the tail to induce arthritis. After eleven days, rats received a reinforcement of the same emulsion in another site of the tail. Animals were killed at the day 21 after the first immunization, by

gas chamber. The gastrocnemius muscle was dissected for histopathological analysis and stored at -80°C. The tibio-tarsic joint was removed to confirm the development of arthritis through histological analysis. Hind paws were excised and fixed in 10% buffered formalin for 5 days. Paws were then decalcified with nitric acid 10% for 24 h. The following score system was used to evaluate individual joints and measure arthritis severity (9): *synovial inflammation*: five high-power magnification fields (HMF) were scored for the percentage of infiltrating mononuclear cells as follows: 0, absent; 1, mild (1–10%); 2, moderate (11–50%); 3, severe (51–100%); *synovial hyperplasia*: 0, absent; 1, mild (5–10 layers); 2, moderate (11–50 layers); 3, severe (>20 layers); *extension of pannus formation based on the reader's impression*: 0, absent; 1, mild; 2, moderate; 3, severe; *synovial fibrosis*: 0, absent; 1, mild (1–10%); 2, moderate (11–50%); 3, severe (51–100%); *cartilage erosion*: Percentage of the cartilage surface that was eroded: 0, absent; 1, mild (1–10%); 2, moderate (11–50%); 3, severe (51–100%); *bone erosion*: 0, none; 1, minor erosion(s) observed only at HMF; 2, moderate erosion(s) observed at low magnification; 3, severe transcortical erosion(s).

Assessment of locomotion.

Before the induction of arthritis (Day 0) and at the end of every week (Days 7, 14 and 21), rats were placed individually inside an acrylic box (Monitor de Atividade IR) of 60 cm x 40 cm. Spontaneous exploratory locomotion of animals was detected by sensors bars located in the sides of the movement box during 5 min, after 30 seconds of adaptation time (adapted (10)). The movement's detection were sent to and evaluated by the computer software Insight Equipamentos Ltda® in the following parameters: route design, walked distance, medium velocity, resting time, number of times standing.

Histology.

For histological examination 6- μ m sections of the muscle of all animals were analyzed after staining with *hematoxylin-eosin* (HE) for muscle fiber atrophy (score of 0 = absent and 1 = present), inflammatory infiltration (score of 0 = absent, 1 = mild, 2 = moderate and 3 = severe), edema (score of 0 = absent, 1 = mild, 2 = moderate and 3 = severe), sarcoplasmic rarefactions (score of 0 = absent, 1 = mild, 2 = moderate and 3 = severe); and with *periodic acid schiff* (PAS), to evaluate whether type 1 and 2 fibers proportions were maintained and the type of atrophic myofiber.

Fiber cross-sectional area.

Two straight lines crossing in right angle at the fiber center were drawn, determining the transverse section area and using the medium between the diameters. 10 pictures were taken of each section and 20 fibers were measured from each picture using the software Image-Pro Express (version 5.1.0.12, Media Cybernetics).

Immunoblot.

For Western blot analysis, muscles were homogenized with Tris buffer 10 mM. Sample protein concentration were measured using Bradford assay. Membranes were marked with anti-MuRF-1 (Santa Cruz Biotechnology), anti-miogenin (L8918, Sigma) and anti-LC3 (M5815, Sigma) (11).

Statistical Analysis.

Results are expressed as mean values with 95% confidence intervals (95%IC) when symmetric variables and as median and percentiles (25% and 75%) when asymmetric variables. The data were compared by Student *t* test, χ^2 and ANOVA, followed by Tukey. Significance was accepted at $p < 0.05$. Values were analyzed using the statistical package SPSS 13.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Joint Histopathology.

The histopathologic study of tibio-tarsic joints confirmed all the parameters associated to the joint disease. The CIA animals presented sinovial inflammation, hiperplasia, *pannus*, fibrosis, cartilage and bone erosion, confirming the presence of a severe arthritis (Supplementary Table 1). Joints of IM animals had the same pattern as the CO.

Animal and muscle weight.

The CO animals increased 20% of their weight during the experimentation period, while the CIA animals maintained the same weight. Significant differences in animal weights were observed in the last two weeks of experimentation (Figure 2). Accordingly, the gastrocnemius muscle weight and the relative muscle weight (muscle weight in mg divided by total animal weight in g) were lighter in CIA (0.89 ± 0.06 g and 5.06 ± 0.37 mg/g) than CO (1.30 ± 0.07 g and 6.35 ± 0.39 mg/g), demonstrating significant loss of muscle tissue.

Animal locomotion.

The locomotion was evaluated weekly. In the two last weeks of the experimental period, the CIA animals walked less, with reduced velocity, standing up less and rested more than the CO animals (Figure 1), stressing the importance of a immobilization control group to identify atrophy factors not related to increased resting.

Histological Findings.

Gastrocnemius muscles were evaluated through HE staining. CIA muscles showed myofiber atrophy, inflammatory infiltration and edema. IM muscles had myofiber atrophy and edema, without inflammation (Table 1). No apoptotic body was observed in this staining.

PAS staining allowed the identification of the fiber types. The proportion of fibers types (type 1 and 2) was similar in all experimental groups, although type 2 myofibers showed more marked size reduction (data not showed).

Myofiber cross-sectional area of the IM and CIA groups were significantly smaller than the CO group, with a reduction of 34% and 60%, respectively (Table 1).

Muscle molecular markers

After the histopatological study of morphological changes, we focused in the molecular pathways involved in muscle loss. Through immunoblotting, significantly increased expression of MURF-1 (indicative of proteosome activation) and myogenin (satellite cell activation) were observed in the gastrocnemius muscle of CIA rats, in comparison to the control animals, while no such changes were observed in the IM group (Table 2). Expression of LC3, marker of autophagy, remained similar between the experimental groups (data not showed).

DISCUSSION

Although clinically common (5) and already described in experimental models (12), muscle atrophy and its development mechanisms in RA are still unknown. Whereas in disease states associated with inflammation, such as cancer cachexia, AIDS, sepsis, and arthritis, there are a complex procatabolic hormonal and cytokine environment, disuse atrophy is a relatively uncomplicated form of muscle loss, dependent almost solely on the loss of mechanical input. It is therefore predictable that muscle loss mainly due to disuse alone would be governed by mechanisms somewhat different from those in inflammatory states (13).

During the development of arthritis, especially at the end of the experimental observation, there was a 90% reduction of locomotion in CIA animals. Hartog *et. al.* (10) have also observed impaired locomotion in animals with more severe arthritis

associated with muscle atrophy, and a reduction in the relative muscle weight confirmed there is accentuated muscle loss compared to total weight loss. Ozawa *et al* (14) have described a reduction of 20% in the muscle weight of animals with adjuvant arthritis. Hartog *et. al.* (10) have reported reduced weight of different types of muscles (soleus, gastrocnemius, tibialis anterior and exterior digitorum longus) in CIA mice model. Okiura *et al* (12) have described body and muscle weight reduction in this model, along with a reduction in the relative muscle weight.

Myofiber cross-sectional area reduced 34% in CIA, while Okiura *et al* (12) observed a reduction of ~15% cross-sectional area in myofibers of CIA animals, mainly those with severe arthritis. Da Silva (2006) (15) immobilized the hindlimb paw of Wistar animals for seven days and detected a reduction of 43% in myofiber cross-sectional area, whereas the immobilization of this study lasted 10 days and caused a reduction of 60%, confirming the efficacy of our immobilization method.

In the present study, myofiber atrophy, edema and mild inflammatory infiltration were observed in muscle histology, evidence for the presence of an inflammatory process. Ozawa *et al* (14) have not identified pathological changes in soleus and femoral muscles by optic microscope in a model of adjuvant arthritis. However, electronic microscopy analysis demonstrated degenerative changes in the muscle of these animals. In immobilized (IM) animals there was myofiber atrophy and edema without inflammation.

Muscle proteolysis could be affecting the whole muscle or primarily certain fiber types, each having specific characteristics of function and metabolism. The results in this study showed a marked atrophy of type 2 myofibers, which are fast fibers, with less vascularization and resistance but higher glycogen quantity. Fink *et. al.* (16) described fiber type 2 atrophy in patients with a degenerative joint disease, osteoarthritis, that were submitted to knee prosthesis surgery.

Some proteolytic systems have been described to be involved in muscle degradation, such as the process of autophagy, proteases activated by calcium (calpain and caspase) and the ubiquitin-proteasome system (6).

Autophagy is an ancestor mechanism of cell survival by self consuming during times of nutritional privation that occurs with cytoplasmatic components and is lysosome dependent. According, the results obtained in this study, the autophagy pathway is not activated in any models developed in this study, CIA and IM, since LC3 expression did not differ from CO. Mizushima et al (2004), demonstrated through the overexpression of LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) the activation of the autophagy system in the skeletal muscle of starving mice (17).

One important system involved in muscle loss in the ubiquitin-proteasome pathway. Some studies demonstrated that proteasome subunits and ubiquitin-ligase enzymes have enhanced expression during muscle atrophy, as well as increase in the expression of E3 ligases in different models of muscle wasting (18), showing the connection between E3 activity (MuRF-1 and atrogen-1) and loss of muscle mass (18).

In this study, an enhanced expression of MuRF-1 was observed in the muscle of CIA rats, a result not observed in IM animals. In studies with experimental animal model of chronic inflammation, muscle increase of E3 ubiquitin ligases MAFbx/atrogen-1 and MuRF-1 was observed (4). Other studies using models of immobilized paws observed higher expression of this enzyme (19), however this increased expression was not observed in the model used. One possible explanation for this difference in the experimental results is the occurrence of a depression in muscle protein synthesis instead of enhanced proteolysis (13). Revising articles of human muscle loss, Murton et al (20) suggested that the activation of these proteins occur mainly in inflammatory processes, while non-inflammatory muscle conditions, such as disuse atrophy, would derive from other pathways.

Other pathway involved in muscle atrophy could be deficient activation of satellite cells (SC). Myogenin and MyoD are used as molecular markers of SC,

indicating proliferation and differentiation of these quiescent myogenic precursors, respectively (21). SC may be activated in response to different growth, remodeling and lesion stimuli, including inflammation (11).

This article demonstrated an increase in myogenin expression in the muscle of CIA animals, while IM was unchanged. In other models of disuse atrophy like unloading and denervation, myogenin is similar to control (22). In an experimental model of muscular contusion, causing acute inflammatory response, our laboratory demonstrated the association of this inflammatory process and muscle regeneration, involving a role of nitric oxide in the activation and differentiation of SC (11). In an animal model of chronic inflammation (CIA), arthritic mice developed muscle atrophy and was observed an increase in the expression of the proteins MyoD and myogenin, meaning proliferation and differentiation of satellite cells (4).

CONCLUSIONS

This study demonstrated that the development of experimental arthritis is associated to muscle atrophy, weight loss, muscle degradation and lost of mobility in these animals, which indicates that these processes may be involved in rheumatoid sarcopenia. For the first time it is demonstrated that muscle atrophy in arthritis was associated with the disease itself, and not simply due to the decreased mobility, since the immobilized group presented a smaller myofiber cross-sectional area with no activation of the atrophy pathways (myogenin and MURF-1) involved in muscle loss. Even so, it is still unclear what pathways are triggering muscle proteolysis and regeneration, and the relation of the two with inflammation. It is important to emphasize the necessity of further studies to elucidate the signaling and cellular pathways involved in muscle atrophy of arthritis.

AKNOWLEDGMENTS

Employees of Unidade de Experimentação Animal (HCPA) and Dr Marcelle Reesink Cerski helped to perform this work.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

1. Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol.* 2004;31(3):594-7.
2. Summers GD, Deighton CM, Rennie MJ, Booth AH. Rheumatoid cachexia: a clinical perspective. *Rheumatology.* 2008;47(8):1124-31.
3. Tracey KJ, Morgello S, Koplín B, Fahey TJ, Fox J, Aledo A, et al. Metabolic effects of cachectin tumor-necrosis-factor are modified by site of production - Cachectin tumor necrosis factor-secreting tumor in skeletal-muscle induces chronic cachexia, while implantation in brain induces predominately acute anorexia. *Journal of Clinical Investigation.* 1990;86(6):2014-24.
4. Castillero E, Martín AI, Lopez-Menduina M, Granado M, Villanua MA, Lopez-Calderon A. IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2009;309(1-2):8-16.
5. Fukuda W, Omoto A, Oku S, Tanaka T, Tsubouchi Y, Kohno M, et al. Contribution of rheumatoid arthritis disease activity and disability to rheumatoid cachexia. *Modern Rheumatology.* 2010;20(5):439-43.
6. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2004;287(4):C834-C43.
7. Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Leger B, Russell AP. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology.* 2011;461(3):325-35.
8. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology.* 2008;23(3):160-70.
9. Brenner M, Meng HC, Yarlett NC, Joe B, Griffiths MM, Remmers EF, et al. The non-MHC quantitative trait locus *Cia5* contains three major arthritis genes that differentially regulate disease severity, pannus formation, and joint damage in collagen- and pristane-induced arthritis. *Journal of Immunology.* 2005;174(12):7894-903.
10. Hartog A, Hulsman J, Garssen J. Locomotion and muscle mass measures in a murine model of collagen-induced arthritis. *Bmc Musculoskeletal Disorders.* 2009;10.
11. Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. *Nitric Oxide.* 2011;24(1):43-9.
12. Okiura T, Nagatomo F, Gu N, Taguchi Y, Morimatsu F, Ishihara A. Bone density of the femur and fiber cross-sectional area and oxidative enzyme activity of the tibialis anterior muscle in type II collagen-induced arthritic mice. *J Physiol Sci.* 2008;58(4):221-7.
13. Phillips SM, Glover EI, Rennie MJ. Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology.* 2009;107(3):645-54.
14. Ozawa J, Kurose T, Kawamata S, Yamaoka K. Morphological changes in hind limb muscles elicited by adjuvant-induced arthritis of the rat knee. *Scand J Med Sci Sports.* 2009.

15. da Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Cancelliero KM, Durigan JLQ. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006;39(7):979-85.
16. Fink B, Egl M, Singer J, Fuerst M, Bubenheim M, Neuen-Jacob E. Morphologic changes in the vastus medialis muscle in patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*. 2007;56(11):3626-33.
17. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell*. 2004;15(3):1101-11.
18. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VKM, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001;294(5547):1704-8.
19. Caron AZ, Drouin G, Desrosiers J, Trenz F, Grenier G. A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *Journal of Applied Physiology*. 2009;106(6):2049-59.
20. Murton AJ, Constantin D, Greenhaff PL. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 2008;1782(12):730-43.
21. Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2005;16(4-5):585-95.
22. Giger JM, Haddad F, Qin AX, Zeng M, Baldwin KM. Effect of unloading on type I myosin heavy chain gene regulation in rat soleus muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2005;98(4):1185-94.

FIGURES AND TABLES

Table 1: Histopathological study of gastrocnemius muscles at Hematoxilin-Eosin staining.

		Control (n=7)	Immobilized (n=5)	CIA (n=7)	Significance
Atrophy	Perifascicular	0.1±0.16	0.0±0.0	0.6±0.84*	*p<0.05
	Multifocal	0.2±0.26	1.25±0.5*	1.2±0.92*	*p<0.05
Inflammatory infiltrated	Endomísio	0.1±0.24	0.0±0.0	1.1±0.74*	*p<0.05
	Perimísio	0.0±0.0	0.0±0.0	0.9±0.74*	*p<0.05
Edema		0.1±0.24	1.75±0.5*	0.8±0.79*	*p<0.05
Sarcoplasmatic vacuoles		0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.32	ns
Myofiber diameter (µm)		69.2± 9.57	40.0±3.89*	59.9±9.0.8*	*p<0.05
Myofiber area (µm ²)		7175.6±1418.24	1396.3±121.32*	4233.6±1066.12*	*p<0.05

Values expressed in means±SD.

*p<0.05 versus control group

ns = not significative

Table 2: Quantification of MuFR-1 and myogenin of gastrocnemius muscles through immuno blot.

	Control (n=7)	Immobilized (n=5)	CIA (n=7)	Significance
LC3	104,68±9,36	98,57±6,25	102,60±9,43	ns
MuRF-1	1790.5±222.97	1804.6±218.89	6302.3±561.04*	*p<0.05
Myogenin	505.3±113.71	498.9±108.87	2175.4±190.87*	*p<0.05

Values expressed in means±SD.

*p<0.05 versus control group

ns = not significative

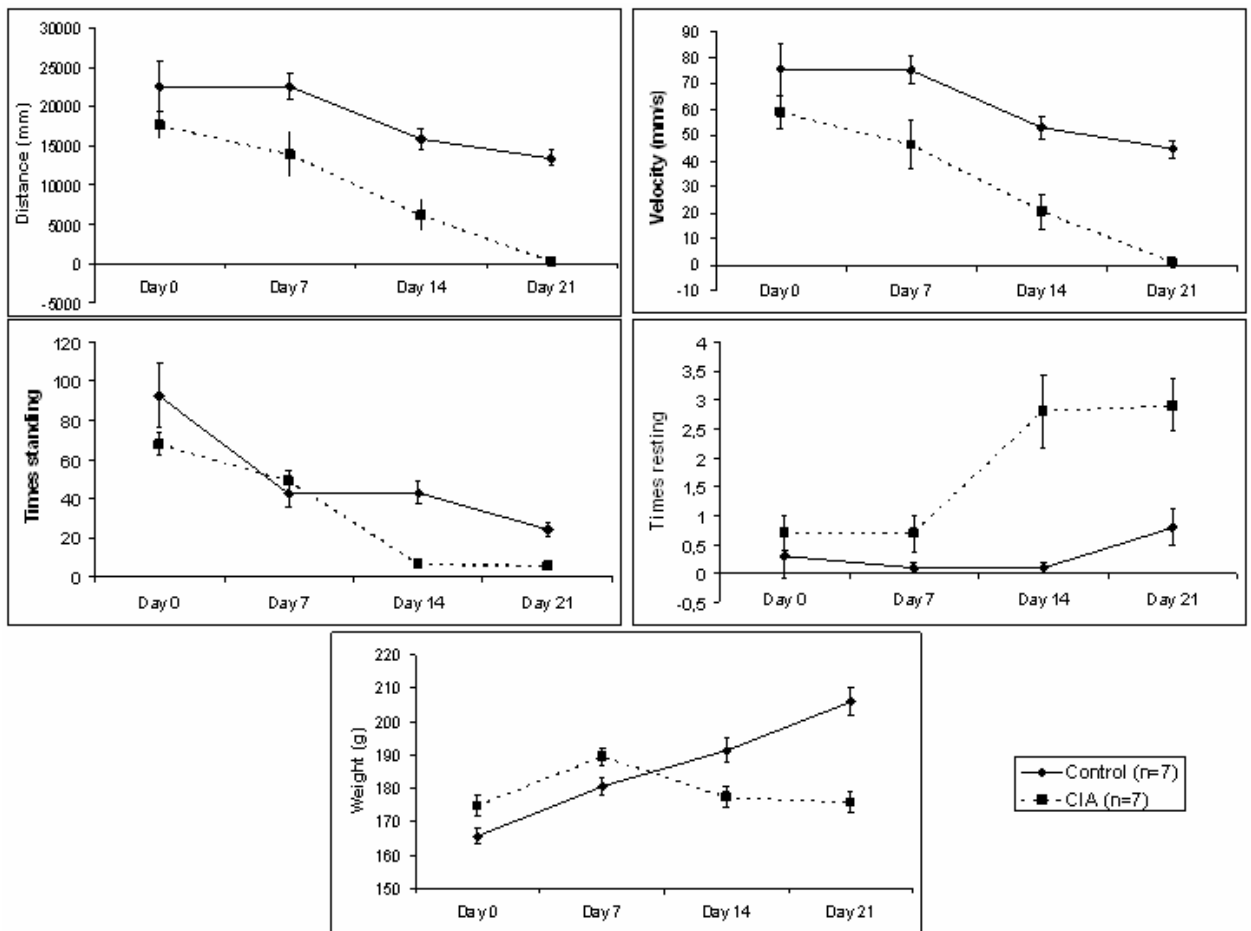


Figure 1: Weight, walking distance and velocity, times standing and resting of CO and CIA animals.

SUPPLEMENTARY DATA



Supplementary Figure 1. Picture of the paw of different groups: A- Control; B- Immobilized and C- Collagen-induced arthritis (CIA).

Supplementary Table. Histopathological score of the animal's left ankle sinovia.

	Control (n=7)	Immobilized (n=5)	CIA (n=7)	Significance
Sinovial inflammation	0.0±0.0	0.0±0.0	2.6±0.70*	*p<0.05
Sinovial hiperplasy	0.0±0.0	0.0±0.0	0.8±0.48*	*p<0.05
Pannus extension	0.0±0.0	0.0±0.0	1.5±0.88*	*p<0.05
Sinovial fybrosis	0.0±0.0	0.0±0.0	1.8±1.00*	*p<0.05
Cartilage erosion	0.0±0.0	0.0±0.0	1.2±0.75*	*p<0.05
Bone erosion	0.0±0.0	0.0±0.0	1.8±1.00*	*p<0.05

Values expressed in means±SD.

*p<0.05 versus control group.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo demonstrou que o desenvolvimento da artrite experimental está associado a processos envolvidos na sarcopenia reumatoide.

- Perda de peso, processo gradual e progressivo associado ao desenvolvimento da artrite;
- Perda da mobilidade, observado pela diminuição dos parâmetros de caminhada nos animais CIA;
- Perda de massa muscular, comprovada pela menor proporção peso muscular/peso corporal total dos animais CIA;
- Atrofia muscular, demonstrada pela menor área seccional das miofibras das ratas CIA;

Pela primeira vez foi demonstrado que a atrofia muscular na artrite está associada com o desenvolvimento da doença e não com sinais secundários como dor e redução da mobilidade, visto que o grupo IM apresentou menor área seccional da miofibrila sem ativação das vias de atrofia (MuRF1 e miogenina) envolvidas na perda muscular. Ainda assim, as cascatas envolvidas e o gatilho que inicia a proteólise muscular ainda não estão claros, sendo necessários mais estudos para identificar bons marcadores e possíveis alvos para novas terapias.

As diversas vias intracelulares envolvidas, de maneira inter-relacionada, com o processo de perda de massa muscular como apoptose celular, proteólise das miofibrilas e alteração na regeneração celular através das células satélites, vêm sendo ativamente estudadas em diversas condições experimentais e clínicas. Observa-se que esses mecanismos não estão presentes de maneira uniforme nessas condições, havendo variação significativa na importância relativa de acordo com a situação clínica. Portanto, é provável que o melhor manejo preventivo e terapêutico também não seja o mesmo para todas as situações de atrofia muscular.

Apesar de significativa perda de massa muscular que ocorre na maioria dos pacientes com artrite reumatoide, com um profundo impacto socioeconômico e funcional nesta população, não há até o momento proposta terapêutica padronizada para essa complicação. Há muito poucos estudos avaliando o impacto das terapias atuais na perda de massa muscular. Da mesma forma, conforme discutimos acima,

praticamente não existem estudos sobre a participação das diversas cascatas que levam a atrofia e a regeneração muscular em modelos experimentais ou em pacientes com artropatias crônicas. Mais estudos nessa área serão de grande relevância, pois uma maior compreensão dos mecanismos de modulação entre catabolismo e anabolismo muscular deverá resultar em desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras mais eficazes e melhor qualidade de vida a esses pacientes.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Na continuidade desse trabalho, pretendemos estudar o papel do óxido nítrico como potencializador da ativação de células satélites e da regeneração muscular. Também pretendemos estudar o uso do exercício como estratégia terapêutica para diminuição da inflamação e melhoria da proteólise muscular causada pela artrite. Dentro desses modelos, pretendemos nos deter nas rotas intracelulares envolvidas na perda protéica e que seriam alteradas por essas diferentes estratégias.

Como resultados prévios, já se estabeleceu em modelo de CIA em camundongos isogênicos DBA/J1 que o pico da perda muscular ocorre 35 dias após a indução da doença, observado através da diminuição da locomoção e área da miofibra reduzida. A partir desse ponto, serão estabelecidos os tempos dos diferentes tratamentos para obter-se o melhor efeito de cada.