

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A PERDA MUSCULAR NA
ARTRITE EXPERIMENTAL**

Jordana Miranda de Souza Silva

Orientador: Dr. Ricardo Machado Xavier

Co-orientadora: Lidiane Filippin

Porto Alegre, dezembro de 2013.

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A PERDA MUSCULAR NA
ARTRITE EXPERIMENTAL**

Jordana Miranda de Souza Silva

Trabalho de conclusão de curso de Biomedicina elaborado no Laboratório de Doenças Autoimunes e Infecciosas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob orientação do professor doutor:

Ricardo Machado Xavier

Porto Alegre, dezembro de 2013.

Índice Geral

1. Resumo	4
2. Introdução.....	5
2.1. Artrite Reumatoide	5
2.1.1. Autoimunidade	5
2.1.2. Influência Genética.....	6
2.1.3. Fatores de Risco Ambientais	7
2.1.4. Alterações Articulares	7
2.3.4 Citocinas e Inflamação	9
2.2. Alterações Musculares na Artrite Reumatoide	9
2.2.1. Mecanismos de Perda Muscular	11
2.2.1.1. Proteases Lisossomais	11
2.2.1.2. Proteases ativadas por cálcio: calpaína e caspases	11
2.2.1.3. Sistema ubiquitina-proteassomo.....	12
2.2.1.4. Envolvimento das células satélites	14
2.3. Exercício Físico na Artrite Reumatoide	14
3. Objetivos.....	15
4. Artigo.....	16
5. Conclusões e Perspectivas	30
6. Referências	30

1. Resumo

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória crônica que afeta as articulações sinoviais e está associada à incapacidade progressiva, complicações sistêmicas, morte precoce e elevados custos socioeconômicos. A inflamação crônica pode levar ao aumento nos níveis de degradação protéica e provocar déficits no processo de regeneração muscular resultando em pronunciada perda muscular. Estima-se que 66% dos pacientes com AR apresentem algum grau de comprometimento muscular. O exercício físico, devido ao seu efeito antiinflamatório, poderia modular o sistema imune melhorando sua função e, conseqüentemente, minimizar a perda muscular decorrente da inflamação crônica na AR. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do exercício físico sobre cascatas de sinalização no processo de perda muscular em modelo experimental de artrite. Camundongos DBA1/J (fêmeas de 8-12 semanas de idade) com artrite induzida por colágeno (CIA) foram divididos em dois grupos: CIA não-tratado (CIA) e CIA tratado (EXE). Os animais do grupo tratado foram submetidos a exercício físico aeróbico moderado, em esteira, 30 minutos por dia, 5 dias por semana durante quatro semanas. O escore clínico de artrite foi avaliado diariamente. A locomoção exploratória espontânea e o peso foram avaliados semanalmente. Após eutanásia, os músculos tibial anterior e gastrocnêmio foram dissecados e utilizados para histologia e análise da expressão protéica por western blot, respectivamente. Utilizou-se de teste t de amostras independentes e foi considerado significancia estatística para um valor $p < 0,05$. Os parâmetros clínicos (escore clínico, edema da pata e peso do animal) e o peso dos músculos não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Não foi observada diferença na distância percorrida no teste de locomoção espontânea, bem como na área da miofibra do músculo entre os grupos experimentais. A expressão de MuRF-1 (proteína associada a degradação muscular), Pax-7 (marcador de proliferação de células satélite), miogenina (marcador de diferenciação de células satélite) não apresentou diferença significativa entre os grupos. Assim, apesar de programas de exercícios representarem um bom método para reversão da perda protéica presente na AR, seu efeito positivo não foi observado neste estudo. Vale ressaltar que neste programa de exercícios foram utilizados animais fêmeas onde as influências hormonais devem ser consideradas devido à importante função da testosterona na formação de massa muscular. Este programa de exercício também apresentou algumas limitações, tais como: a velocidade de corrida fixa e o tempo reduzido de corrida.

2. Introdução

2.1. Artrite Reumatoide

Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica que acomete as articulações sinoviais provocando erosão óssea e cartilaginosa e conseqüente destruição articular. A prevalência da AR está em torno de 1% na população mundial e 0,46% na população brasileira e a incidência é maior em mulheres com idade entre 40 e 60 anos. A evolução da doença está associada à incapacidade progressiva, complicações sistêmicas, morte precoce e elevados custos socioeconômicos (1).

Dada à presença de auto-anticorpos, como o fator reumatóide e o anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP), os quais podem preceder as manifestações clínicas da doença em muitos anos, a AR é considerada uma doença autoimune. Autoimunidade e inflamação articular e sistêmica levam ao progresso destrutivo da doença (2010 Rheumatoid arthritis classification criteria). A AR é uma doença de etiologia multifatorial, em cuja patogênese estão envolvidos desencadeadores genéticos e ambientais. A predisposição genética consiste da presença dos alelos HLA-DR1 e DR4 e entre os fatores ambientais, o fumo é o mais conhecido e estudado (2). (Citrullinated proteins in Rheumatoid Arthritis)

A principal função das moléculas HLA de classe II é apresentar peptídeos antigênicos para células T CD4+. Inicialmente, a AR é caracterizada pela presença de células T CD4+ na sinóvia, as quais amplificam a resposta imune pela estimulação de outras células mononucleares, fibroblastos sinoviais, condrócitos, e osteoclastos. A liberação de citocinas, especialmente fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), causa inflamação sinovial e estimula a liberação de metaloproteinases de matriz, promovendo, assim, a degradação do tecido conjuntivo. Além disso, a osteoclastogênese estimulada por células T CD4+ ativadas acarreta, também, dano articular (3).

2.1.1. Autoimunidade

Muitos indivíduos com AR produzem um grupo de auto-anticorpos denominados fatores reumatoides os quais são reativos com determinantes nas regiões Fc das imunoglobulinas G (IgGs). O fator reumatoide clássico é um anticorpo IgM, IgA ou IgG com tal reatividade, porém a classe IgM é a que se detecta sorologicamente com maior frequência. Esses anticorpos ligam-se à IgG normal circulante, formando

complexos IgM-IgG que são depositados nas articulações. Estes complexos imunes podem ativar a cascata do complemento, resultando em uma reação de hipersensibilidade do tipo III, que leva à inflamação crônica das articulações.

Ainda assim, o fator reumatoide é um marcador não específico para AR, pois pode estar presente em altos títulos em infecções crônicas e em outras doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico e síndrome de Sjögren. Além disso, pode também ser detectado em populações adultas de indivíduos saudáveis.

Outros anticorpos frequentemente associados com a AR são os anticorpos anti-CCP, os quais possuem sensibilidade de 80% e especificidade de 98% em pacientes com a doença (Citrullinated proteins in Rheumatoid Arthritis). Esses anticorpos podem ser detectáveis no soro anos antes do início dos sintomas da AR, embora com menor sensibilidade, e há também uma correlação entre seus títulos e a severidade da doença (4).

A citrulinação, conversão de um resíduo de arginina em citrulina, é uma modificação pós-traducional capaz de ativar a resposta imune. Essa conversão é catalisada pela enzima peptidil arginina deaminase (PAD). Cinco isoformas de PAD foram identificadas com diferentes expressões em tecidos e órgãos, sendo PAD2 e PAD4 as enzimas principalmente associadas com a geração de auto-antígenos citrulinados na AR. (Auto-Antibodies to Citrullinated Proteins and Rheumatoid Arthritis).

Várias proteínas citrulinadas têm sido descritas como tendo alta especificidade para AR, incluindo colágeno tipo I e tipo II, fibrinogênio e vimentina (Citrullinated proteins in Rheumatoid Arthritis). Assim, os peptídeos citrulinados, mas não os nativos, estimulariam respostas de células T específicas, visto que a citrulinação eleva a imunogenicidade dos peptídeos auto-antigênicos (5).

2.1.2. Influência Genética

Diferenças alélicas podem resultar em diferentes respostas do sistema imune devido à variação na habilidade de apresentar antígenos processados ou na habilidade das células T de reconhecer o antígeno.

Os alelos HLA-DR compartilham sequências de aminoácidos glutamina-leucina-arginina-alanina, os quais compõem o denominado epítipo compartilhado. Essa sequência é encontrada em múltiplos genes DR associados a AR, incluindo DR1, DR4 e DR14. Peptídeos com uma conformação restrita, os quais se encaixam no sulco formado por esses resíduos de aminoácidos, podem desencadear a ativação de células T.

Peptídeos citrulinados possuem especificidade de ligação a epítomos compartilhados, pela acomodação de citrulina, e não de arginina (5).

Assim, os mecanismos relacionados ao início do processo patofisiológico da sinovite reumatoide podem envolver células T ativadas, expressando HLA-DR com o epítomo compartilhado. As células T podem fazer reação cruzada com antígenos próprios, levando à estimulação de macrófagos tanto através da liberação de citocinas quanto por contato direto entre células (6).

2.1.3. Fatores de Risco Ambientais

O tabagismo é o fator de risco mais bem estabelecido no desenvolvimento de AR. Uma hipótese a respeito de efeito do cigarro é de que fumar favorece a citrulinização de peptídeos e, no contexto de genes de susceptibilidade para AR, contribui para a indução da imunidade a esses peptídeos citrulinados e, eventualmente, para o aparecimento da AR (7).

A nicotina, o principal componente do cigarro, é um forte modificador da resposta inflamatória, mas, além dela, o cigarro contém mais de 4500 outros compostos químicos. Dessa maneira, pode ser que as associações entre o hábito de fumar e as doenças inflamatórias crônicas sejam independentes da nicotina, e sim guiadas por reações do hospedeiro a componentes inaláveis não-nicotínicos do tabaco (8).

A sílica, outro estressor brônquico, também foi descrita como fator de risco para AR severa, bem como agentes infecciosos, como *Porphyromonas gingivalis*, associado a doenças periodontais.

Os demais potenciais fatores de risco incluem a consumo de álcool, consumo de café, uso de contraceptivos orais e baixo nível socioeconômico, embora evidências para esses últimos fatores de risco sejam fracas (1).

2.1.4. Alterações Articulares

A sinóvia envolve as articulações e auxilia nas suas funções ao fornecer suporte estrutural, lubrificar superfícies e fornecer nutrientes à cartilagem. O revestimento articular consiste de uma delicada membrana que é dividida em dois compartimentos anatômicos e funcionais: camada íntima e camada sub-íntima. A primeira é a camada superficial que está em contato com a cavidade intra-articular e produz o líquido sinovial. Normalmente, apresenta duas a três camadas de células de espessura e é

composta de dois tipos de células em proporções iguais: células do tipo A ou sinoviócitos do tipo macrófago e células do tipo B ou sinoviócitos do tipo fibroblasto. A camada sub-íntima da sinóvia abriga os vasos sanguíneos sinoviais e normalmente possui pouquíssimas células.

Na AR inicial, a membrana sinovial se torna espessa devido à hiperplasia e hipertrofia das células que compõem a sinóvia. Uma grande quantidade de vasos sanguíneos se forma na sinóvia (angiogênese) e há infiltração de células T (predominantemente CD4+) e células B (algumas das quais se tornam plasmócitos) na membrana sinovial. Estas células também estão presentes no fluido sinovial juntamente com outros tipos celulares, como os neutrófilos. Nos estágios iniciais da AR, a membrana sinovial começa a invadir a cartilagem. Na AR estabelecida, a membrana sinovial se transforma em um tecido invasivo chamado pannus. O pannus invasivo, composto tanto de sinoviócitos do tipo A quanto do tipo B e plasmócitos, invade e destrói a cartilagem e o osso subcondral (Figura 1) (3).

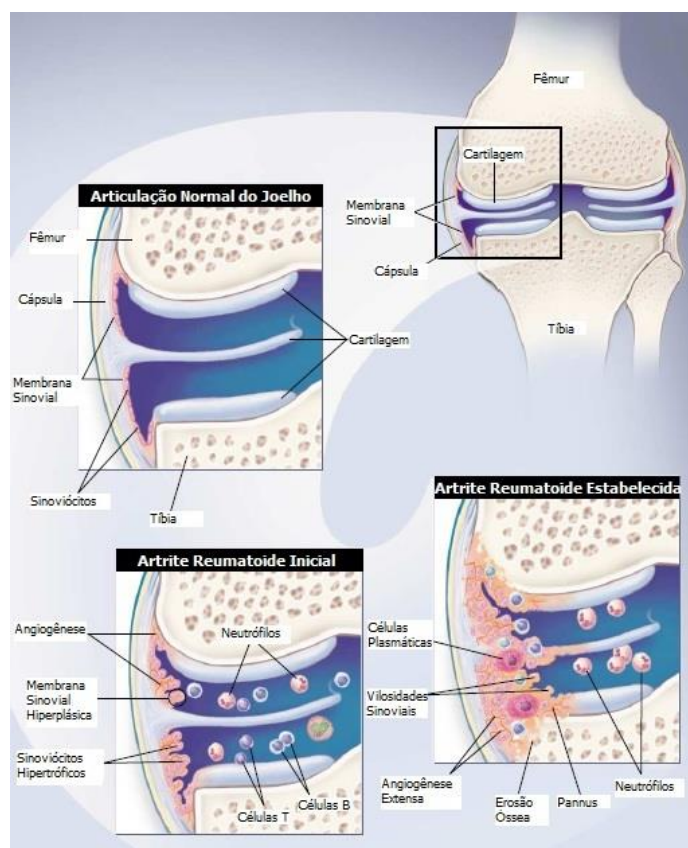


Figura 1. Representação da inflamação sinovial e processo subsequente de destruição articular presentes na AR. Adaptado de CHOY e PANAYI, 2001. New Engl. J. Med., v. 344, p. 907-916, 2001. 4

2.3.4 Citocinas e Inflamação

Citocinas desempenham funções chaves na iniciação de sinovite reativa, na transformação dessa resposta autolimitada em um processo agressivo e destruidor de tecido, e na perpetuação da sinovite crônica, sendo que IL-1 e TNF- α permanecem no centro das vias de inflamação e destruição tecidual. (5).

Células T ativadas por antígeno estimulam monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais a produzirem as citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α . TNF- α e IL-1 são potentes estimuladores de células mesenquimais, como fibroblastos sinoviais, osteoclastos, e condrócitos, que liberam metaloproteinases de matriz (MMPs) destruidoras de tecido. IL-1 e TNF- α também inibem a produção de inibidores teciduais de MMPs pelos fibroblastos sinoviais. Essas duas ações levam ao dano articular (3).

Em adição, células T CD4⁺ expressam ligantes de osteoprotegerina que estimulam a osteoclastogênese e também estimulam células B a produzirem imunoglobulinas como o fator reumatóide. Macrófagos ativados, linfócitos e fibroblastos, bem como seus produtos, podem também estimular a angiogênese, a qual pode explicar o aumento da vascularização encontrado na sinóvia de pacientes com AR.

As células endoteliais sinoviais ativadas expressam moléculas de adesão que promovem o recrutamento de células inflamatórias para dentro das articulações. Esse processo é aumentado pela liberação de quimiocinas, como IL-8, pelas células inflamatórias na articulação (3).

2.2. Alterações Musculares na Artrite Reumatoide

A AR é caracterizada por sinovite crônica, simétrica e erosiva. As articulações mais frequentemente afetadas são as sinoviais periféricas, como metacarpo e metatarso-falangianas, tornozelos e punhos. No entanto, também pode haver comprometimento de joelhos, ombros, cotovelos e quadris (Arthritis & musculoskeletal disorders). Edema, dor e calor local são características das articulações afetadas, que podem ainda apresentar rubor local. Deformações articulares ocasionadas por inflamação persistente são características da AR não tratada.

Em adição aos danos inflamatórios articulares, ósseos e sistêmicos que ocorrem na AR, estima-se que 66% dos pacientes com AR apresentem algum grau de comprometimento muscular (9).

O músculo esquelético é o tecido mais abundante no corpo humano, e a manutenção da sua massa é essencial para garantir funções básicas como locomoção,

força e respiração, além da manutenção da postura e da temperatura corporal. A decisão de sintetizar ou degradar proteínas musculares é regulada por diversas vias de sinalização que transmitem estímulos externos para fatores de regulação da transcrição gênica. O delicado balanço de degradação e síntese de proteínas musculares está perturbado em alguns distúrbios, como na caquexia (10).

A caquexia pode ocorrer no contexto de uma resposta inflamatória crônica como na AR. Na síndrome caquética há perda de massa corporal magra enquanto que a massa gorda tende a se manter ou a aumentar. Dessa maneira o peso corporal se mantém estável, ao menos nos estágios iniciais. No entanto, com a evolução da doença a caquexia é uma importante causa de perda de peso e de maiores taxas de morbimortalidade em pacientes com AR.

A caquexia reumatóide (CR) se refere à perda de massa celular corporal, predominantemente de músculo esquelético, e tem consequências que incluem reduzida força muscular, metabolismo de energia alterado e aumentada susceptibilidade a infecções. A etiologia da CR é multifatorial e inclui produção excessiva de citocinas, inatividade física e ação periférica da insulina reduzida (11).

Embora os efeitos catabólicos desempenhados pelas citocinas não sejam amplamente conhecidos, parece que citocinas ditas “músculo ativas” (e.g. TNF- α , IL-1, IL-6, INF- γ e TGF- β) são capazes de degradar o músculo esquelético por ativação de alguma via de degradação de proteínas, como o sistema ubiquitina-proteossomo, ou através de déficits no processo de regeneração envolvendo as células satélites (CS). Isso causa um aumento no gasto energético de repouso, bem como um efluxo de aminoácidos do músculo para o fígado, e uma mudança na síntese hepática de proteínas: ao invés de produção de albumina ocorre a produção de proteínas de fase aguda como fibrinogênio e proteína C reativa. Em curto prazo, essa mudança ou adaptação é favorável para a sobrevivência, no entanto, em longo prazo, essa mudança é deletéria e pode causar caquexia.

A inatividade física em pacientes com AR pode ser causada por dor articular, mobilidade restrita e fadiga. O resultado final é um círculo vicioso, onde a inflamação leva à dor, destruição articular e perda de massa muscular resultando em redução da atividade física e conseqüente redução da força muscular (12).

A ação periférica da insulina é reduzida em pacientes com AR. A insulina age inibindo a degradação de proteína muscular, sendo, então, um potente hormônio anabólico.

A CR, portanto, deveria ser vista como um importante contribuinte para a aumentada morbidade e prematura mortalidade na AR. O entendimento das anormalidades e mecanismos envolvidos no desenvolvimento da CR pode ajudar a identificar potenciais novos alvos terapêuticos (13).

2.2.1. Mecanismos de Perda Muscular

As diversas condições que levam a perda de massa muscular envolvem distintas cascatas de sinalização intracelular. As diferentes cascatas de sinalização podem levar a morte celular programada (apoptose), ao aumento da degradação protéica ou ainda a diminuição da ativação das células-satélite responsáveis pela regeneração muscular.

2.2.1.1. Proteases Lisossomais

A autofagia ocorre com o consumo de componentes citoplasmáticos, como o citosol e organelas celulares, e é dependente do 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 (14).

2.2.1.2. 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 e possuem um inibidor endógeno, a calpastatina, que regula sua atividade (15) (16).

As calpaínas não são capazes de degradar proteínas em aminoácidos ou pequenos peptídeos e não catalisam 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 (17) (18).

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. Uma vez ativadas, as caspases são responsáveis por degradar uma série de proteínas, e assim iniciar o processo de apoptose (19).

A caspase-3 parece ter a capacidade de degradar do complexo actina-miosina. A caspase-3 também pode ser ativada via caspase-12, por cálcio intracelular livre ou via caspase-9 por disfunção mitocondrial (liberação de citocromo c). Apesar de ativadas na perda muscular, o real papel desempenhado pelas caspases ainda é controverso (20).

2.2.1.3.Sistema ubiquitina-proteassomo

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, gerindo assim processos celulares básicos (21) (22).

Proteínas celulares destinadas à degradação pelo proteassomo 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 distintos: 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 (23). Esse processo de degradação de proteína poli-ubiquitinadas ocorre no proteassomo (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 (Figura 2) (24).

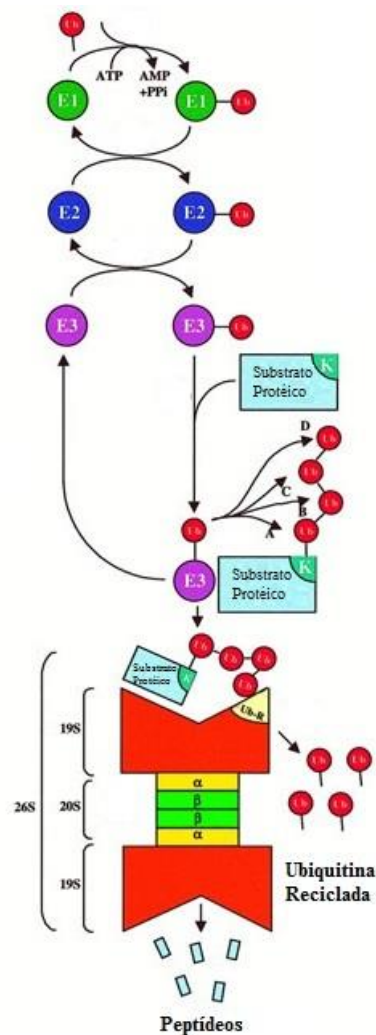


Figura 2. Desenho esquemático da degradação de proteínas pelo sistema Ubiquitina-proteossomo. Adaptado de *The EMBO Journal* (1998).

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 ubiquitinação de um grupo de substratos protéicos (Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes). No músculo esquelético foram identificadas duas E3 específicas que estão relacionadas ao processo de atrofia: a atrogina-1 (*Muscle Atrophy F-box* - MAFbx) e a MuRF-1 (*Muscle Ring Finger-1*) (24).

Alguns estudos descreveram o aumento da expressão de subunidades do proteossomo e de enzimas ubiquitinantes durante a atrofia muscular (25), bem como aumento da expressão de E3 ligases em modelos de denervação, imobilização, restrição alimentar, diabetes e uremia (25). Esses estudos sugerem que a perda muscular está relacionada com a atividade das E3 ligases MuRF-1 e atrogina-1 (26). O papel da via

do proteassomo relacionado com a perda muscular em humanos foi revisado por Murton et al, sugerido que a ativação das ubiquitinas-ligases MAFbx/atrogin-1 e MuRF-1 ocorre principalmente durante processo inflamatórios (27).

2.2.1.4. Envolvimento das células satélites

Além da degradação protéica, déficits no processo de regeneração também podem estar envolvidos na perda muscular.

As Células Satélites (CS) são precursores miogênicos quiescentes encontrados no músculo adulto e apresentam algumas propriedades de células tronco (28). As CS podem ser ativadas em resposta a estímulos de crescimento, remodelamento ou lesão muscular (29). 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 levam a hipertrofia das fibras musculares (30).

No músculo normal células satélites expressam marcadores como Pax-7 (31). A manutenção e a proliferação das CS podem ocorrer na ausência de Pax-7, porém de maneira defeituosa, sugerindo que esse marcador apresente um importante papel antiapoptótico (32). Após a injúria e/ou ativação das CS, a expressão de MyoD é induzida em 12 horas, antes mesmo da expressão de PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) - marcador para proliferação celular. Já a expressão de miogenina, esta ocorre tardiamente durante a fusão e diferenciação (33). Por outro lado, a miostatina representa um marcador envolvido na regulação negativa da ativação das CS, pois conduz à inibição da diferenciação e da proliferação de mioblastos (The role of myostatin in muscle wasting: an overview).

2.3. Exercício Físico na Artrite Reumatoide

Pacientes com AR apresentam menor atividade física e fatores que contribuem para isso incluem dor e rigidez articulares, alterações metabólicas, que levam à perda de massa e de força muscular, e simples desuso. A inatividade física está associada com alterações em processos fisiológicos que levam à perda muscular e à resistência à insulina. Falta de estímulo muscular efetivo diminui as taxas de rotatividade de músculo e de proteínas corporais com a inibição da síntese protéica. Esses fatores levam ao início e à progressão da caquexia reumatoide (CR).

A CR não possui tratamento padrão atualmente, dessa maneira, medidas para controlar essa condição devem ser direcionadas aos seus fatores etiológicos, como produção em excesso de TNF- α e IL-1 β e reduzida atividade física (11).

Para corrigir as mudanças na composição e no metabolismo corporal que ocorrem com a artrite inflamatória, é necessária uma abordagem visando a reabilitação e os programas de exercício estruturados oferecem um bom método para atingir esse objetivo. O exercício físico é factível e seguro em pacientes com AR controlada e pode melhorar o desempenho físico, a capacidade cardiovascular e a força muscular em nesses indivíduos. Além de representar uma abordagem crucial para contrabalancear os prejuízos funcionais associados à CR, o exercício permite aos pacientes a lidar com a doença enquanto reduz o risco de doenças concomitantes (12).

Em nível sistêmico há vários relatos indicando a redução nos níveis circulantes de marcadores inflamatórios seguidos de exercícios de longo prazo em indivíduos saudáveis e acima do peso. Esses biomarcadores incluem IL-6, proteína C reativa e moléculas de adesão (34).

A contração das fibras musculares produz e libera IL-6, a qual induz diversos efeitos metabólicos, como lipólise e oxidação lipídica, e está envolvida na homeostase da glicose durante o exercício. Em adição, IL-6 possui forte efeito antiinflamatório, ao exercer efeitos inibitórios sobre a produção de TNF- α e IL-1 β , e pode inibir a resistência à insulina induzida pelo TNF- α . O aparecimento de IL-10 e do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) na circulação após o exercício também contribui com o efeito antiinflamatório do exercício (35).

No entanto, para delinear um programa de exercícios para pacientes com AR é importante considerar o status da doença. O treinamento de resistência é um grande estímulo anabólico, pois aumenta a força muscular e o funcionamento físico e deveria, portanto, ter um efeito direto positivo na manutenção da massa muscular. O treinamento aeróbico, por outro lado, poderia ser especialmente útil na prevenção de complicações em longo prazo da caquexia, como resistência à insulina e doenças cardiovasculares. (12).

3. Objetivos

Avaliar o efeito do exercício físico aeróbico moderado sobre a perda muscular de animais com artrite induzida por colágeno (CIA).

4. Artigo

A revista escolhida para a publicação do trabalho de conclusão de curso realizado durante o semestre 2013/2 foi a *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. Este periódico abrange temas relacionados à composição corporal e à perda de massa muscular no processo de envelhecimento e em condições de doença, sendo a primeira revista científica dedicada à pesquisa sobre caquexia e sarcopenia.

EFFECT OF EXERCISE OVER MUSCLE WASTING IN EXPERIMENTAL ARTHRITIS

Jordana Miranda de Souza Silva¹; Adriano Rostirolla Linhares¹; Paulo Vinicius Gil Alabarse²; Paula Ramos Viacava¹; Laura de Lima Xavier¹; Lidiane Isabel Filippin²; Ricardo Machado Xavier².

1. Laboratório de Doenças Autoimunes e Infecciosas, HCPA, Porto Alegre – RS – Brasil; 2. Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre – RS – Brasil.

Rua Ramiro Barcelos, 2350, Bairro Rio Branco

CEP 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

Email: jo-msouza@hotmail.com

Phone number: (51) 3359 8837

Abstract

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, autoimmune inflammatory disease that primarily affects synovial joints. As a consequence of the disease, RA patients typically suffer from severe joint pain, reduced muscle strength, and impaired physical function. Chronic inflammation may lead to an imbalance between protein catabolism and anabolism and to deficits in muscle regeneration, resulting in significant skeletal muscle wasting. Exercise may improve immune function, due to its anti-inflammatory effect, and prevent muscle wasting caused by chronic inflammation. The

aim of this research is to evaluate the effect of physical exercise on weight loss and muscle wasting signaling cascades in experimental arthritis.

Methods: female DBA1/J mice with collagen-induced arthritis (CIA) were randomly divided into two groups: CIA non-treated (CIA; n = 7) and CIA treated (EXE; n = 7). After the onset of the disease, EXE group was submitted to moderate aerobic exercise on a treadmill, 30 minutes a day, 5 days per week for 4 weeks. CIA untreated group remained sedentary. Data was analyzed with two-way ANOVA followed by Bonferroni and independent sample t-test and $p < 0.05$ was considered significant. Hind paw swelling and clinical score of arthritis were evaluated daily. Spontaneous exploratory locomotion and animal weight were assessed weekly. After death, tibialis anterior muscle was collected for histological analysis. Gastrocnemius muscle was collected for protein analysis, such as MuRF-1, PAX-7 and myogenin, that was assessed by immunoblot.

Results: Hind paw swelling and clinical score of arthritis reached no statistical differences between groups. Also, no differences were detected in spontaneous exploratory locomotion as well as animal weight. Whereas, expression of PAX-7 (satellite cells proliferation marker), myogenin (satellite cells differentiation marker) and MuRF-1 (muscle breakdown marker) showed no difference between groups. The expression of myostatin was enhanced in EXE group.

Conclusion: although physical exercise appears as an interesting approach to reverse muscle wasting caused by arthritis, its positive effect was not seen in this exercise protocol. Female animals were used in this exercise program and, therefore, hormonal influences must be considered due to the important role of testosterone on the generation of muscle mass. Further studies with male animals and different exercise protocols are necessary to elucidate the effect of this approach over muscle wasting.

Keywords: collagen-induced arthritis; exercise; chronic inflammation; muscle.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory disease characterized by the progressive destruction of the joints (Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts). Given the presence of autoantibodies, such as rheumatoid factor (RF) and anti-citrullinated protein, RA is considered an autoimmune disease (2010 Rheumatoid arthritis classification criteria). Its prevalence is around 1.0% in the world adult population and the greatest incidence occurs in women between 40 and 60 years of age. The risk for development of RA is attributable to genetic and environmental factors, where HLA-DR1 e DR4 locus represents the strongest genetic association and smoking is the main environmental risk (5).

In the pathology of RA, inflammatory cascades lead to persistent synovial inflammation and associated damage to articular cartilage and underlying bone (Rheumatoid Arthritis). Antigen-activated CD4+ T cells stimulate monocytes, macrophages, and synovial fibroblasts to produce the cytokines interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor α (TNF- α) and to secrete matrix metalloproteinases which leads to tissue destruction.

In addition to the joint, bone, and systemic inflammatory damage, nearly two-thirds of all patients with RA experience a muscle wasting condition known as cachexia. In cachexia, lean body mass is lost while fat mass tends to be maintained or even increased so that body weight, at least in the early stages, can remain stable. The etiology of rheumatoid cachexia includes excessive cytokine production, physical inactivity, reduced peripheral insulin action and inadequate protein ingestion cachexia (13).

Rheumatoid cachexia has no standard treatment, but countermeasures against it may be aimed at excess production of TNF- α and IL-1 and low habitual physical activity (13). There are reports indicating a reduction in circulating levels of inflammatory biomarkers following physical exercise in healthy or overweight individuals. Considering this, it is interesting to target exercise as a great approach in preventing muscle wasting caused by chronic inflammation (34).

This study was designed to explore the effect of exercise over muscle wasting in experimental arthritis. A protocol of low-intensity exercise was chosen in order to try to reduce muscle impairments without worsening joint inflammation.

Materials and Methods

Animals and experimental groups

Female DBA1/J mice from 8 to 12 weeks of age were used. According to the protocol used, at this age, mice are susceptible to develop collagen-induced arthritis (CIA) (Collagen induced Arthritis). The animals were reared at 20°C, with 12-h light–dark cycles 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 and the Graduate Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

The experimental animals were randomly divided into two groups: CIA non-treated (CIA; n = 7) and CIA treated (EXE; n = 7). After the onset of the disease, EXE group was submitted to moderate aerobic exercise on a treadmill, 30 minutes a day, 5 days per week for 4 weeks. CIA untreated group remained sedentary.

The training protocol take place as follows: the animals begin with an increasing speed of 9 m/min for 5 minutes, speed will be maintained at 12 m/min for 5 minutes and finally for 15 m/min for 10 minutes, then the speed will decrease to 12 m/min for 5 minutes and finally to 9 m/min for 5 minutes.

Induction of arthritis

Arthritis was induced with bovine type II collagen (CII; Chondrex Inc., Redmond, WA, USA) dissolved in 0.1M acetic acid at 4°C for 12 h and emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA; Sigma, St Louis, MO, USA) containing inactivated *Mycobacterium tuberculosis*. Equal volumes of CII (2 mg/mL) and CFA (1 mg/mL) were mixed to form the emulsion. During the procedure, mice were anesthetized with Isoflurane (1mL/mL; Abbott Lab., Abbott Park, IL, USA). In the begin of the experiment, set as day zero, 0.1mL of emulsion was injected intradermically at the base of the tail to induce arthritis (Collagen induced Arthritis). After 18 days, mice received a reinforcement of bovine type II collagen emulsified with incomplete Freund's adjuvant in another site of the tail. Twenty-eight days after the onset of the disease, the animals were anesthetized with isoflurane and killed by cervical dislocation. After death, ankle joint and tibialis anterior muscle were collected for histological analysis and gastrocnemius muscle was collected for protein analysis.

Clinical severity and measurement of edema

Arthritis severity was clinically determined for each paw, daily, according to the following scale of 0 to 4: 0 - no evidence of erythema and swelling; 1 - erythema and mild swelling confined to the tarsals or metatarsals; 2, erythema and moderate swelling of tarsal and metatarsal or tarsal and ankle joints; 3 - erythema and severe swelling extending from the ankle to metatarsal joints; and 4 - erythema and severe swelling encompassing the ankle, foot and digits, or ankylosis of the limb. The most clinical score that a mouse could have reached was 16. The day of arthritis incidence was considered on the first signs of arthritis (when a grade of 1 or more could be visible for the first time in at least one paw). Joint edema was daily assessed by measuring size of latero-lateral length extent of the hind paws metatarsus with a digital caliper.

Assessment of locomotion

After booster and at the end of every week, mice were placed individually inside an acrylic 60-40 cm box (Monitor de Atividade IR, Insight Equipamentos Ltda_ Ribeirão Preto, SP, Brazil). Spontaneous exploratory locomotion of the animals was detected by sensors bars located in the sides of the movement box for 5 min after 30 s of adaptation time (adapted from: Locomotion and muscle mass measures in a murine model of collagen-induced arthritis). The data from the movement detection were sent to and evaluated by the computer software Insight Equipamentos Ltda® (Ribeirão Preto, SP, Brazil) using the following parameters: route design, walked distance and velocity, and number of times standing and resting.

Joint histopathology

The tibio-tarsic joints from the hind limbs were excised and fixed in 10% buffered formalin for five days. The joints were decalcified with 10% nitric acid for 24 h and paraffin mounted. The joints were sectioned into 4 mm slices and stained with hematoxylin-eosin (HE). The following score system was used to evaluate the individual joints and to measure the experimental arthritis severity by a blinded pathologist: 16 *synovial inflammation* – five high-powered 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%); and *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).

Myofiber cross-sectional area

To determine the myofiber area, the muscle fiber diameter was measured, and the myofiber cross-sectional area (CSA) was calculated. Using the software Image-Pro Express (version 5.1.0.12; Media Cybernetics, Rockville, MD, USA), 10 images were taken of each gastrocnemius muscle per rat, and 20 fibers were measured from each image, totaling 200 myofibers measured (Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity).

Immunoblot

For the protein quantification, the gastrocnemius muscles were homogenized with Tris buffer 10mM and protease inhibitors. The sample protein concentration was measured using the Bradford assay. The membranes were marked with anti-PAX-7, anti-myostatin, anti- MuRF-1 and anti-myogenin (1:1000 L8918; Sigma) and quantified by Western Blotting technique. (Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle). These protein expressions were normalized by GAPDH expression.

Statistical analysis

The results are expressed as mean values with standard deviations (SD) for the symmetric variables. Data was analyzed with ANOVA Two-Way followed by Bonferroni and independent sample t-test and $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Clinical severity and measurement of edema

All animals used in the study developed clinically detectable arthritis. Clinical severity of arthritis and joint edema were not significantly different between groups (Fig. 1 and 2). Notwithstanding that, it could be observed a slight improvement of scores (not significant) in EXE group, over the first nine days after the onset of disease.

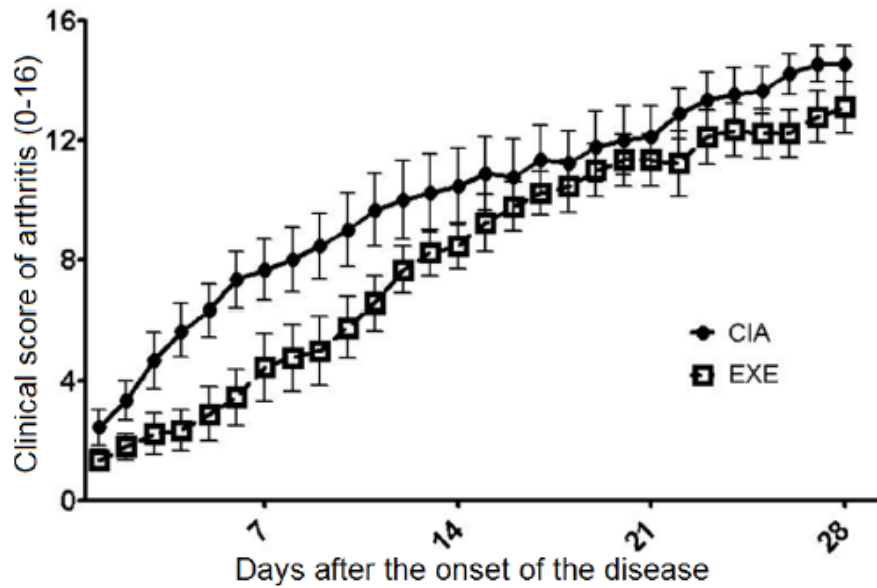


Fig. 1 Clinical severity of arthritis by clinical score of each paw. CIA = CIA group (filled circles), EXE = exercise group (empty square).

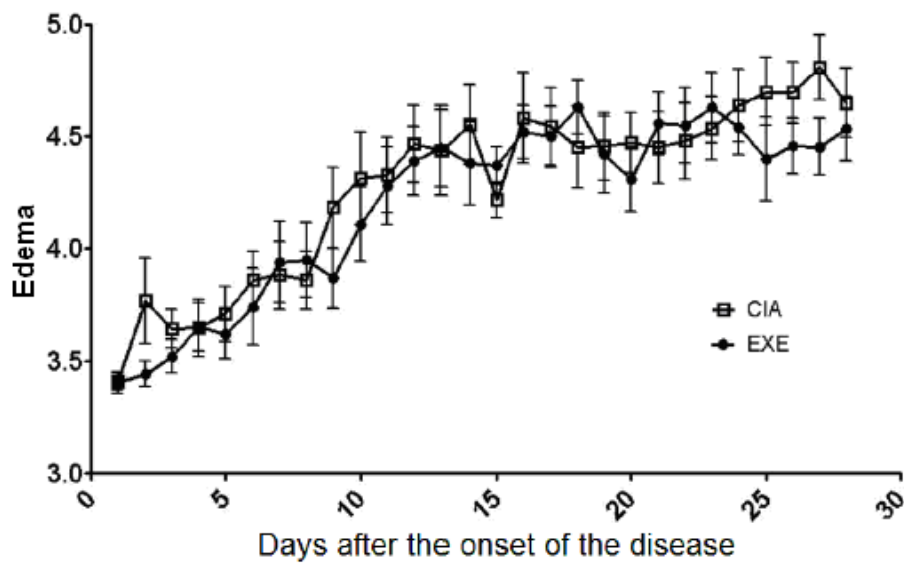


Fig. 2 Clinical severity of arthritis by clinical edema of each paw. CIA = CIA group (empty square), EXE = exercise group (filled circles).

Animal locomotion

Spontaneous exploratory locomotion was evaluated weekly. Locomotion averages was not statistically different between groups (Fig. 3).

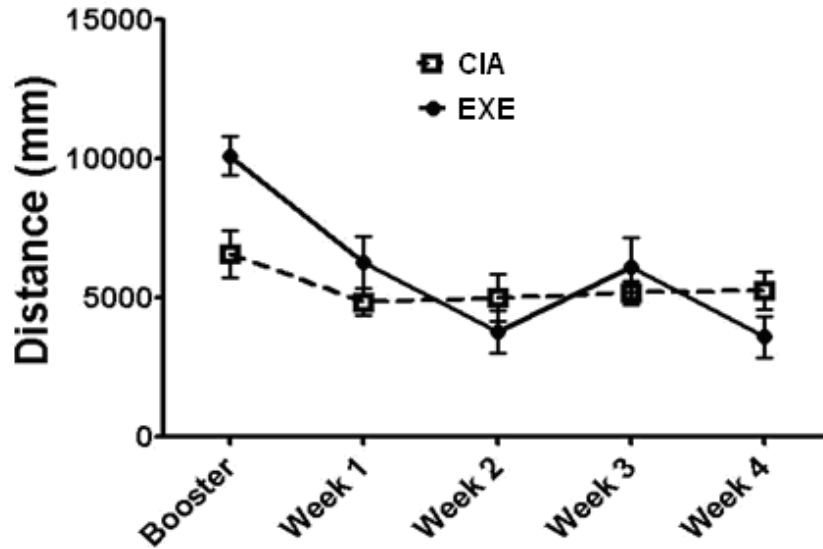


Fig. 3 Mean distances coursed in the assessment of locomotion. CIA = CIA group (empty square), EXE = exercise group (filled circles).

Animal and muscle weight

As shown in figure 4, there was no significant difference between body weights of groups, although there seems to be some trend towards heavier weights in EXE group from third week on. In a similar way, tibial and gastrocnemius muscles weights were heavier in EXE group, with no statistical differences between groups (Fig. 5 and 6) ($p < 0.05$).

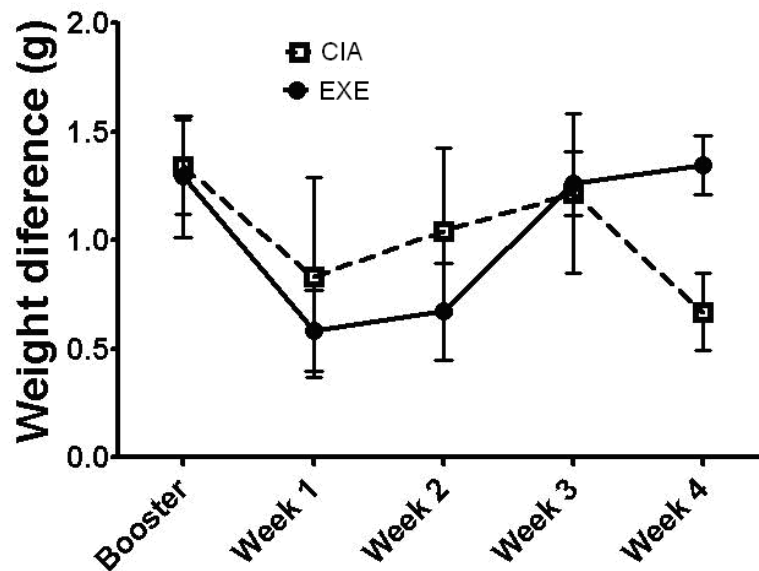


Fig. 4 Mice body weights. CIA = CIA group (empty square), EXE = exercise group (filled circles).

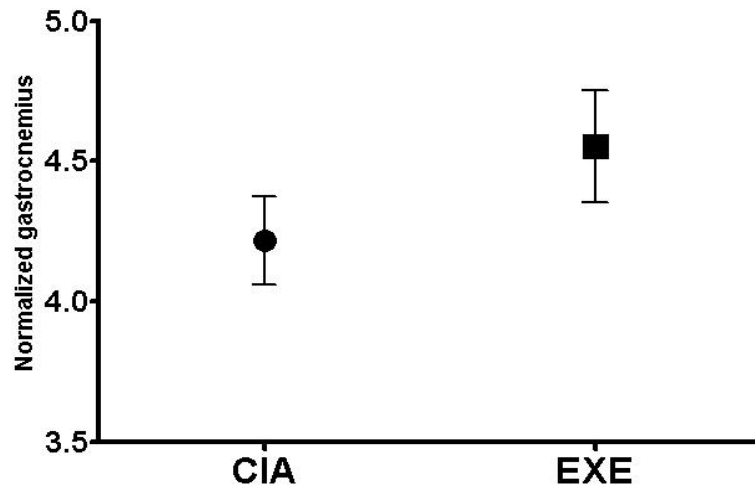


Fig. 5 Gastrocnemius weights normalized to body weights. CIA = CIA group, EXE = exercise group.

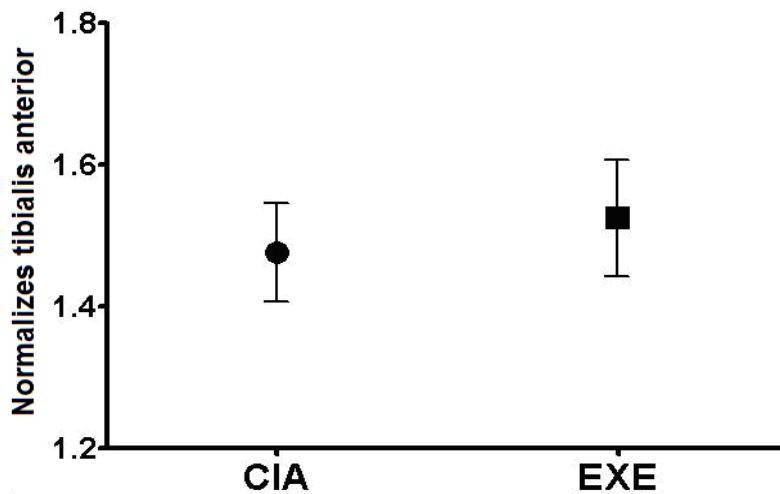


Fig. 6 Tibialis anterior weights normalized to body weights. CIA = CIA group, EXE = exercise group.

Joint histopathology

The histopathological study of the tibio-tarsic joints confirmed all of the parameters associated with the joint disease. The CIA animals presented synovial inflammation, hyperplasia, fibrosis, and cartilage and bone erosion, confirming the presence of severe arthritis. The analysis of joint histopathology was not statistically different between groups (data not shown).

Myofibers cross-sectional area

The tibialis anterior muscle sections stained with HE were evaluated. Myofiber areas showed no significant difference between groups (Fig. 7).

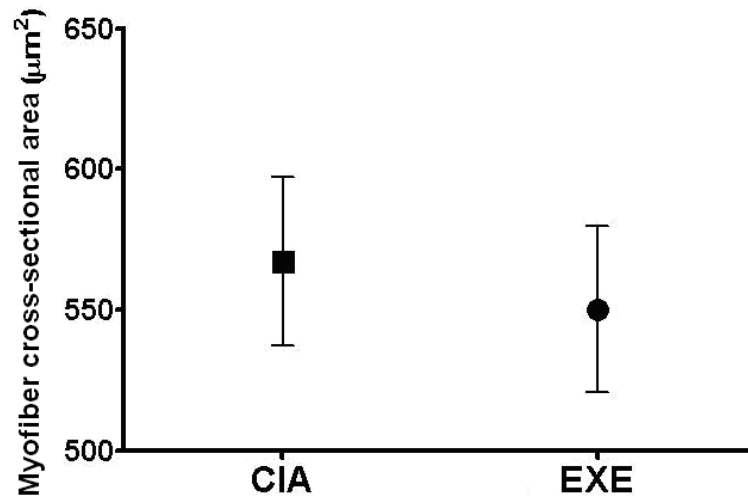


Fig.7 Myofibers cross-sectional area. CIA = CIA group, EXE = exercise group.

Muscle molecular markers

After the histopathological study of the morphological changes, we focused on the molecular pathways involved in muscle loss. Through immunoblotting, the expression of Pax-7 (cell proliferation marker; Fig 8), myogenin (a marker of satellite cell differentiation; Fig. 9) and MuRF-1 (indicative of proteasome activation; Fig. 10) remained similar among the experimental groups. Despite not represent a significant difference, Pax-7 expression decreased 23% and myogenin expression decreased 66% in EXE group when compared with CIA group. Myostatin (a negative regulator of muscle mass; Fig. 11) expression was enhanced in approximately 250% the gastrocnemius muscle of the EXE mice.

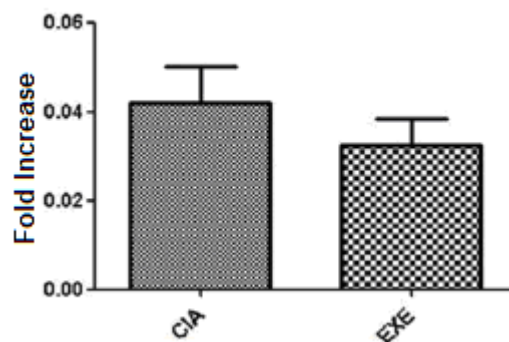


Fig. 8 Pax-7 quantification in gastrocnemius muscle. Expression normalized to GAPDH.

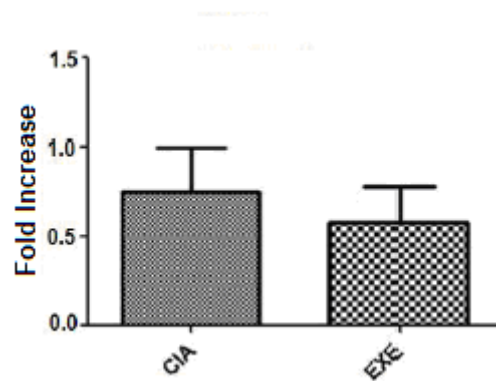


Fig. 9 Myogenin quantification in gastrocnemius muscle. Expression normalized to GAPDH.

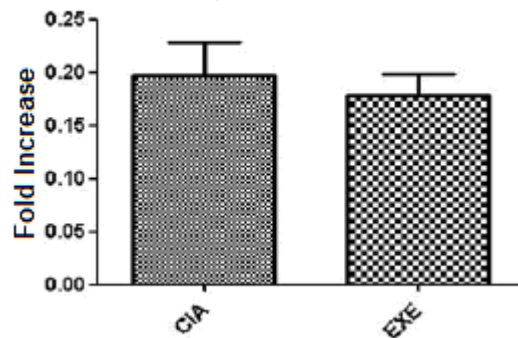


Fig. 10 MuRF-1 quantification in gastrocnemius muscle. Expression normalized to GAPDH.

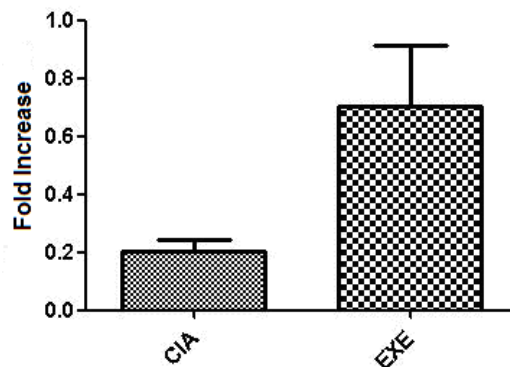


Fig. 11 Myostatin quantification in gastrocnemius muscle. Expression normalized to GAPDH.

Discussion

The maintenance of skeletal muscle mass is essential to ensure basic function as locomotion, strength and respiration, but the tightly regulated balance of muscle protein breakdown and synthesis, as well as muscle regeneration, is disturbed in diseases like rheumatoid arthritis. So far, not many treatment options to avoid muscle wasting are available. Exercise training consists of a promising approach, due to its multifactorial effects, by acting on several signaling pathways (10). This way, in order to verify the effect of exercise over muscle wasting involved in the pathophysiology of RA, in our study, mice were submitted to an aerobic exercise protocol (36).

Studies have demonstrated that patients with RA can tolerate physical exercise program without detrimental effects on joint as long as inflammation is medical-controlled (13). In fact, it had been reported that exercise does not alter swollen joint counts or disease activity (DAS28) (Aerobic exercise is beneficial for people with rheumatoid arthritis). In our study, exercise training did not change clinical parameters of experimental arthritis, such clinical score and edema, confirming that this approach may be used as adjuvant therapy for the disease. Even so, physical exercise has consistently been shown to reduce joint pain, morning stiffness, and fatigue in patients with RA, improving their functionality (Benefits of exercise for patients with rheumatoid arthritis)

A way to assess the functional capacity of animals is to evaluate their spontaneous exploratory locomotion. Hartog et al. observed impaired locomotion in CIA mice with more severe arthritis associated with muscle atrophy (37). In the same way, Teixeira et al. reported a gradual decrease in this parameter in CIA animals compared to healthy animals. Our results demonstrated no changes in spontaneous locomotion in EXE group when compared CIA group, demonstrating that exercise did not worsen the clinical parameters. It should be noted that this experiment had no healthy animals control.

In the same manner, the exercise protocol used in this study did not induce improvement in muscle weights and muscle protein content of animals from EXE group, in comparison with CIA group. Myofibers cross-sectional area, muscle atrophy specific parameter, also showed no difference between groups. From these data, it is possible to see that our exercise program was not able to prevent or minimize muscle wasting in experimental arthritis. Nevertheless, from animal studies of experimental tumor-bearing rodents, endurance training such as running, treadmill walking, and swimming, have been associated with an increase in muscle protein synthesis as well as

in muscle to body weight ratio (10). Based on this information, it seems that our exercise protocol was not efficient enough to reduce muscle loss/wasting. Evidences demonstrated that long-term adaptations to exercise training are the consequence of the cumulative effect of repeated exercise bouts leading to changed levels of specific muscle proteins, such that each bout of contractile activity activates or inhibits molecular events controlling protein synthesis and degradation. We accept that our exercise protocol was unable to induce muscle mass adaptations, possibly because of the training time (4 weeks).

In order to verify the effects of exercise over muscle wasting, myocyte regeneration and protein degradation, it was evaluated by Western blot analysis of Pax-7, myogenin, myostatin and MuRF-1, respectively. However, surprisingly, our results reported the same levels of these markers in both experimental groups.

Deficiencies in the process of muscle regeneration may involve satellite cells (SC) – quiescent muscle stem cells that promote muscle growth and repair. When activated, SC can be identified by the expression of specific markers, such as Pax-7 and myogenin, which are indicators of SC proliferation and differentiation, respectively. Although seeming reduced, no significant differences in the expression of the proteins Pax-7 and myogenin were observed in EXE group. Pax-7 expression decreased 23% and myogenin expression decreased 66% in EXE group when compared with CIA group.

Myostatin, a TGF-member, signals SC quiescence and as well as negatively regulates SC self-renewal (38). Myostatin upregulation was observed in the pathogenesis of muscle wasting during cachexia associated with different diseases (e.g. cancer, heart failure, HIV) (39). Our study demonstrated increase myostatin (+250%) in EXE group than compared the CIA group, this result is possibly associated with the early adaptation to exercise.

An important characteristic of rheumatoid cachexia is the overproduction of inflammatory cytokines. In a cell culture model of differentiated C2C12 skeletal muscle myocytes, it was shown that TNF- α has the potency to induce the expression of myostatin (10).

Increased level of cytokines, such TNF- α , is generally induced by acute exercise, as well as a proinflammatory response characterized by transient leukocytosis, followed by a partial cellular immunosuppressive state and increased secretion of cortisol. In contrast, chronic exercise results in a local and systemic anti-inflammatory response that

promotes tissue adaptation and protects the organism against the development of chronic inflammatory diseases. (Physical exercise, inflammatory process and adaptive condition: an overview).

This way, it may be thought that the exercise protocol used in our study did not reach the baseline of chronic exercise. Thus, it is likely that TNF- α levels increased with exercise and there was a subsequent activation of myostatin. The ability of myostatin to downregulate satellite cell activation may have been the cause of the unchanged levels of myogenin and Pax-7 in EXE group.

With respect to protein degradation, ubiquitin-proteasome system is a cytoplasmatic multiprotein complex that degrades proteins labeled with ubiquitin. A study with chronic resistance training demonstrated that muscle proteolytic genes MuRF-1 and Atrogin-1 were significantly decreased in the exercised group (40). So our results lead to the conclusion that the high expression of MuRF-1 present in induced arthritis was not reverted by the exercise program. This result may be related to severe inflammation, once some researches with animal experiments show that MuRF-1 seems to be essential to TNF- α -induced loss of muscle function (41).

Systemic inflammation involved in development of RA is strongly associated with muscle wasting. This study aimed to investigate whether exercise would be able to minimize muscle impairments in experimental arthritis by the analysis of those parameters described above. Considering that a negative regulator of satellite cell activation showed significant difference between experimental groups, we acknowledge that the exercise protocol was not effective in preventing muscle wasting. It is noteworthy that the exercise program used had fixed running speed for all animals then the exercise performance of each animal was not followed. In addition, the use of female animals is also an important issue, since testosterone and other androgen hormones play a role in muscle maintenance. Such hormones are steroid hormones that exert their effects through binding to cytosolic receptors, which could lead to an increase in protein synthesis and muscle mass (42).

Reported benefits of exercise in RA include improved cardiorespiratory fitness and cardiovascular health, increased muscle mass, reduced adiposity, improved strength, and physical functioning, all achieved without exacerbation of disease activity (Aerobic exercise is beneficial for people with rheumatoid arthritis). Nevertheless, there are still questions about the type, frequency, duration and intensity of the exercise that does not cause pain and presents benefits to patients (43). So it is believable that the

accession of an adapted exercise protocol during a longer period of time, considering the specific performance of each animal, as well as the use of male animals, in a further study, would be helpful in establishing these issues.

5. Conclusões e Perspectivas

Com base nos resultados obtidos em nosso estudo, não foi possível comprovar os efeitos benéficos do exercício físico sobre a perda muscular presente na AR. No entanto, dados da literatura demonstram melhorias no bem-estar geral de pacientes artríticos, além de efeitos sistêmicos relacionados ao efeito antiinflamatório do exercício. Dessa maneira, alterações no protocolo de exercícios, bem como o uso de animais machos em estudos futuros, são abordagens promissoras visando maiores esclarecimentos a respeito do uso do exercício como uma terapia adjuvante no tratamento da AR.

6. Referências

1. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010;376(9746):1094-108.
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. Choy EHS, Panayi GS. Mechanisms of disease: Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(12):907-16.
4. van Boekel MAM, Vossenaar ER, van den Hoogen FHJ, van Venrooij WJ. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Research*. 2002;4(2):87-93.
5. Cooles FAH, Isaacs JD. Pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2011;23(3):233-40.
6. Arend WP. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research*. 2001;45(1):101-6.
7. Kallberg H, Ding B, Padyukov L, Bengtsson C, Ronnelid J, Klareskog L, et al. Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2011;70(3):508-11.

8. Carlens C, Hergens M-P, Grunewald J, Ekbom A, Eklund A, Hoglund CO, et al. Smoking, Use of Moist Snuff, and Risk of Chronic Inflammatory Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010;181(11):1217-22.
9. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2004;287(4):C834-C43.
10. Lenk K, Schuler G, Adams V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle*. 2010;1(1):9-21.
11. Lemmey AB, Jones J, Maddison PJ. Rheumatoid Cachexia: What Is It and Why Is It Important? *Journal of Rheumatology*. 2011;38(9):2074-.
12. Plasqui G. The role of physical activity in rheumatoid arthritis. *Physiology & Behavior*. 2008;94(2):270-5.
13. Walsmith J, Roubenoff R. Cachexia in rheumatoid arthritis. *International Journal of Cardiology*. 2002;85(1):89-99.
14. 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.
15. Goll DE, Thompson VF, Li HQ, Wei W, Cong JY. The calpain system. *Physiological Reviews*. 2003;83(3):731-801.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: The proteasome and the calpains. *J Anim Sci*. 2008;86(14_suppl):E19-35.
20. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*. 1999;68:383-424.

21. Naujokat C, Hoffmann S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Laboratory Investigation*. 2002;82(8):965-80.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Morgan JE, Partridge TA. Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(8):1151-6.
30. 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.
31. Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA, et al. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science*. 2006;119(9):1824-32.

32. Buckingham M, Relaix F. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2007;23:645-73.
33. Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2005;16(4-5):585-95.
34. Lundberg IE, Nader GA. Molecular effects of exercise in patients with inflammatory rheumatic disease. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2008;4(11):597-604.
35. Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2005;98(4):1154-62.
36. Navarro F, Bacurau AVN, Almejda SS, Barros CC, Moraes MR, Pesquero JL, et al. Exercise prevents the effects of experimental arthritis on the metabolism and function of immune cells. *Cell Biochemistry and Function*. 2010;28(4):266-73.
37. Hartog A, Hulsman J, Garssen J. Locomotion and muscle mass measures in a murine model of collagen-induced arthritis. *Bmc Musculoskeletal Disorders*. 2009;10.
38. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *Journal of Cell Biology*. 2003;162(6):1135-47.
39. Elkina Y, von Haehling S, Anker SD, Springer J. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle*. 2011;2(3):143-51.
40. Zanchi NE, de Siqueira Filho MA, Lira FS, Rosa JC, Yamashita AS, de Oliveira Carvalho CR, et al. Chronic resistance training decreases MuRF-1 and Atrogin-1 gene expression but does not modify Akt, GSK-3 beta and p70S6K levels in rats. *European Journal of Applied Physiology*. 2009;106(3):415-23.
41. Adams V, Mangner N, Gasch A, Krohne C, Gielen S, Hirner S, et al. Induction of MuRF1 Is Essential for TNF-alpha-Induced Loss of Muscle Function in Mice. *Journal of Molecular Biology*. 2008;384(1):48-59.
42. Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:19-37.
43. Law R-J, Breslin A, Oliver EJ, Mawn L, Markland DA, Maddison P, et al. Perceptions of the effects of exercise on joint health in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology*. 2010;49(12):2444-51.